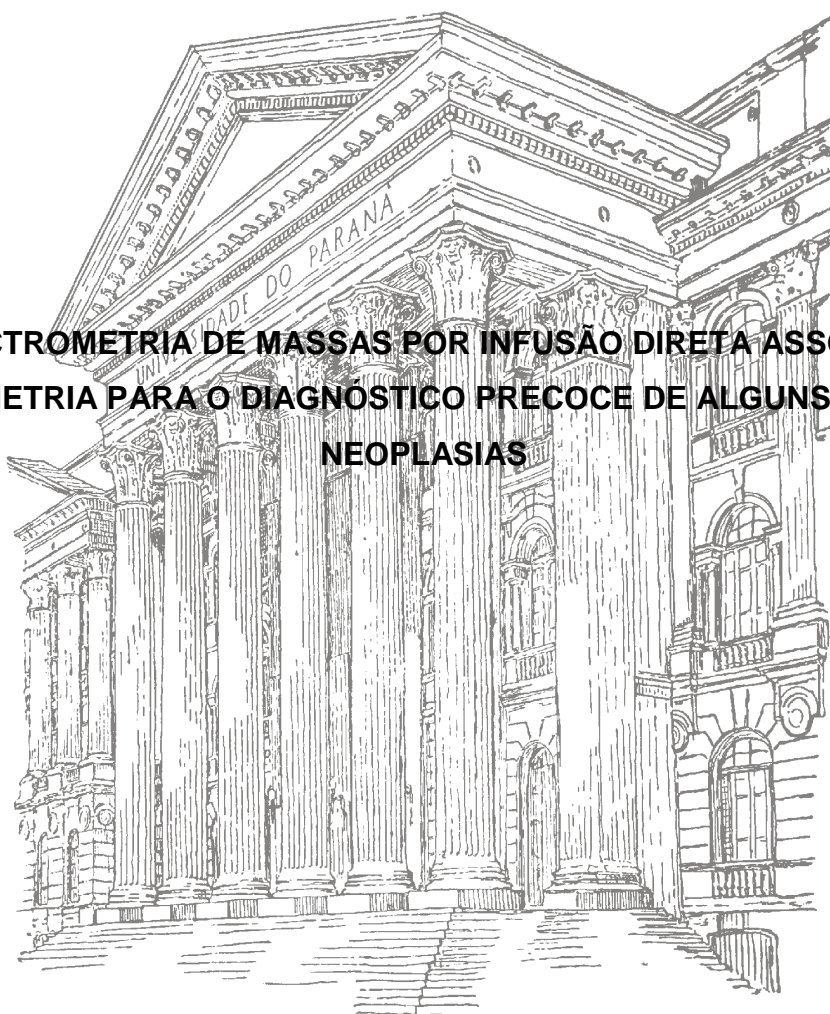


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**THAIS MARTINS GUIMARÃES DE FRANCISCO**

**A ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR INFUSÃO DIRETA ASSOCIADA À  
QUIMIOMETRIA PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE ALGUNS TIPOS DE  
NEOPLASIAS**



**CURITIBA**

**2012**

---

**THAIS MARTINS GUIMARÃES DE FRANCISCO**

**A ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR INFUSÃO DIRETA ASSOCIADA À  
QUIMIOMETRIA PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE ALGUNS TIPOS DE  
NEOPLASIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francinete Ramos Campos

**CURITIBA**

**2012**

---

---

Ao meu marido Rafael,

“Que sempre acreditou em mim e apoiou meu sonho. Por todo incentivo, amor, paciência e compreensão, demonstrando que a superação nos momentos difíceis vale a pena, por estarmos ao lado de quem realmente se importa com o nosso sucesso”

A minha filha Isabella,

“Com o meu amor e como incentivo para a sua vida”

Aos meus pais,

“Razão maior de minha existência e exemplo de amor com que fui criada”

---

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo pela oportunidade oferecida e por me acolher em seu laboratório, por proporcionar os meios de desenvolvimento do trabalho, pela orientação e principalmente pelo bom convívio nestes quatro anos de trabalho. Com ele tive a oportunidade de enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas e sugestões;

A Prof. Dra. Francinete Ramos Campos, na qualidade de amiga e orientadora, obrigada pelos ensinamentos, companheirismo, dedicação e principalmente pela amizade;

A Prof. Dra. Almeriane M. Weffort-Santos, pela dedicação com os cultivos celulares *in vitro*;

A Prof. Dra. Noemi Nagata e Prof. Dr. Patrício Peralta Zamora, pelos ensinamentos de quimiometria;

A Prof. Dra. Maria Regina Kruger, pela doação das células tumorais e ensinamentos técnicos de manuseio dos animais, indução dos tumores e coletas de sangue;

Aos Professores Dr. Patrício Peralta Zamora e Dra. Guihermina Noletto, que na etapa da qualificação (banca prévia) muito contribuíram para esta forma final da tese;

A Prof. Dra. Tania Maria Bordim Bonfim que com todo carinho me fez enxergar que devemos sempre ir a busca de conhecimentos novos gerando percepções diferentes que agreguem valor em nossa vida;

A Luise B. Zozula pela contribuição na indução dos tumores e coleta de sangue dos animais;

A Caroline Paola Uber, por todo acompanhamento do trabalho e ajuda com a manutenção dos animais, repiques celulares e experimentos propriamente ditos;

A João Cleverson Gasparetto, sou imensamente grata por todo incentivo, comentários e observações críticas, pela ajuda com a redação, ajuda na manutenção dos animais e por ser um amigo para todas as horas;

A Letícia Bonâncio Cerqueira, pela amizade e ajuda na manutenção dos animais;

---

---

A todos os colegas de laboratório Flávia Lada Degaut, Sirlei Sayomi, Cleverson Martins, que de forma indireta contribuíram simplesmente por estarem presentes tornando a convivência diária agradável.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional em Pesquisa, CNPq pelo financiamento do projeto.

Ao Departamento de Nutrição da UFPR, por ceder o espaço para manipulação dos animais.

A minha família, em especial a minha irmã Daniele e meus sogros, Jorge e Maria, por todo incentivo, e por estarem sempre dispostos a cuidar de minha filha nos momentos de minha ausência.

A Rita Maria por todo carinho e atenção doados a minha família e a minha casa.

A todos os meus queridos amigos que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas em inesquecíveis encontros.

A todos vocês...

**Muito Obrigada!!**

---

---

## RESUMO

O diagnóstico precoce de neoplasias é a melhor estratégia para o prognóstico e tratamento destas doenças. Neste contexto, algumas tecnologias como a metabonômica são empregadas com o objetivo de obter este diagnóstico, pois são capazes de detectar substâncias (biomarcadores) indicativas do progresso ou estágios da doença. O uso de tecnologias que permitam análises rápidas e sensíveis são muito atrativas na descoberta dos biomarcadores e, por consequência, necessárias para obtenção do diagnóstico precoce. No presente trabalho, o uso da infusão direta por espectrometria de massas utilizando um equipamento de baixa resolução associado a análises quimiométricas (DIMS-PCA) está sendo apresentado para detectar alguns tipos de neoplasias em estágios iniciais destas doenças. Para a condução dos estudos, células tumorais de Ehrlich (TE) foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos das linhagens Balb-C e Swiss e Sarcoma 180 (S-180) em camundongos Swiss, seguido de coleta de sangue intracárdica após 1, 2, 3, 5, 7 e 10 dias da indução dos tumores. O pré-tratamento das amostras foi realizado por meio de precipitação de proteínas com acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoroacético. Após a infusão das amostras no espectrômetro de massas, os dados foram observados por meio de análise de componentes principais (PCA). O método utilizado foi capaz de produzir uma adequada classificação das amostras em grupos experimental (com câncer) e controle (sem câncer) e indicar os íons responsáveis pela diferenciação das amostras. Esta classificação foi obtida após três dias do experimento tanto para TE quanto para S-180, refletindo a viabilidade de obter o diagnóstico precoce destas neoplasias. Além disso, uma excelente diferenciação entre os grupos experimentais e controle foi observada até 10 dias da indução do tumor, sugerindo que os resultados não foram influenciados diretamente pela carga do tumor, mas pela resposta do organismo do animal frente à doença. A identificação dos íons relevantes para discriminação das amostras foi realizada por meio de análises de CLAE-EM/EM, os quais foram relacionados com a classe dos fosfolípidos, particularmente lisofosfatidilcolinas e fosfatidilcolinas, amplamente estabelecidos na literatura por caracterizarem a presença do câncer. A técnica de calibração análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) foi utilizada com sucesso na predição do estágio do desenvolvimento das neoplasias estudadas. O método empregado foi considerado sensível, preciso e seletivo em relação a diferenciação das amostras com e sem câncer e é apresentado como uma ferramenta para o diagnóstico precoce de alguns tipos de neoplasias, com a promissora possibilidade de transferência da metodologia para estudos de neoplasias em humanos.

**Palavras chave:** Metabonômica, Diagnóstico precoce de neoplasias. Infusão direta no espectrômetro de massas, Quimiometria, PCA.

---

---

## ABSTRACT

The possible detection of cancer at early stages means the best prognosis and treatment of disease. Precocious diagnosis can be achieved with technologies such as metabolomics and their approaches, capable to detect substances indicative of the progress or status of the disease (biomarkers). Therefore, the uses of fast and sensitive technologies are attractive for biomarkers discovery and early cancer detection. In this work is being presented the use of direct infusion electrospray ionization mass spectrometry associated with chemometric analysis (DIMS-PCA) for the detection of cancer at early stages. Ehrlich tumor was induced in Balb-C and Swiss mice and Sarcome 180 in Swiss mice, followed by intracardiac blood collection at 1, 2, 3, 5, 7 and 10 days post tumor induction. Protein precipitation with acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid was used for the removal of high molecular weight proteins from the blood serum. Data from the mass spectra were analyzed by principal component analysis (PCA). The used method was capable of producing an adequate classification of samples into an experimental (with cancer) and control (without cancer) groups and indicate the responsible ions for samples differentiation. This classification was obtained after three days of the experiment for both TE and S-180, showing the feasibility of obtaining the early diagnosis of these neoplasms. In addition, the differentiation of experimental and control groups continued until 10 days post tumor induction suggesting that the results were not influenced by tumor burden, but by the tumor metabolism and body response of the animals. The identification of the relevant ions to discriminate between samples was performed by CLAE-EM/EM, which were related to the class of phospholipids, particularly lysophosphatidylcholines and phosphatidylcholines, widely established in the literature by characterizing the presence of cancer. Partial least squares analyses (PLS) were used with successful to predict the stage of cancer development. The method was considered sensitive, precise and selective towards the differentiation of samples with and without cancer and is presented as a tool for early diagnosis of some kinds of neoplasms, with the promising possibility of transferring the methodology for studies of neoplasms in humans.

**Keywords:** Metabolomics. Early cancer detection. Direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. PCA.

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	–	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
C	–	Carbono
CDK	–	Cinases dependentes de ciclinas
CG	–	Cromatografia gasosa
CID	–	Dissociação induzida por colisão
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	–	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial
CP1	–	Primeira componente principal
CP2	–	Segunda componente principal
CPs	–	Componentes principais
Da	–	Daltons
DIMS	–	Infusão direta por espectrometria de massas
DIMS-PCA	–	Infusão direta por espectrometria de massas associada a quimiometria
DNA	–	Ácido desoxiribonucleico
EFS	–	Extração em fase sólida
EM	–	Espectrometria de massas
EM/EM	–	Espectrometria de massas sequencial ( <i>tandem</i> )
EM-EM	–	Espectrometria de massas sequencial
ESI	–	Fonte de ionização por <i>eletrospray</i>
eV	–	Eletronvolts
FT-ICR-MS	–	Espectrometria de massas com ionização por ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier
H	–	Hidrogênio
HCA	–	Classificação hierárquica de agrupamentos
i.p	–	Intraperitônio
ICR	–	Ressonância ciclotrônica de íons
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
kDa	–	Quilodaltons
L	–	<i>Leverage</i>
LCR	–	Líquido cefalorraquidiano
LPC	–	Lisofosfatidilcolina
<i>m/z</i>	–	Relação massa/carga
MALDI	–	Ionização por dessorção a laser em matriz assistida
μL	–	Microlitro
mm	–	Milímetros
mM	–	Milimolar
N	–	Nitrogênio
NIPLS	–	Regressão dos quadrados mínimos parciais não interativos
O	–	Oxigênio
OMS	–	Organização Mundial da Saúde

---



---

P	– Fósforo
p/v	– Peso/volume
PAPM	– Proteínas de alto peso molecular
PC	– Fosfatidilcolina
PCA	– Análise de componentes principais
PLS	– Análise de regressão dos mínimos quadrados parciais
PLS-DA	– Análise de regressão dos mínimos quadrados parciais com análise discriminatória
PSA	– Antígeno próstata específico
PTFE	– Politetrafluoretileno
Q	– Quadrupolo
RMN	– Ressonância Magnética Nuclear
RMSEC	– Raiz quadrada do erro médio de calibração
RMSECV	– Raiz quadrada do erro médio de validação cruzada
RMSEP	– Raiz quadrada do erro médio de predição
RNA	– Ácido ribonucleico
rpm	– Rotações por minuto
S-180	– Sarcoma 180
SELDI	– Ionização por dessorção a laser em superfície melhorada
SUS	– Sistema Único de Saúde
TCA	– Ácido tricloroacético
TE	– Células tumorais de Ehrlich
TFA	– Ácido trifluoracético
TOF	– Tempo de voo
U.I	– Unidade Internacional
V	– Volts
v/v	– Volume/volume
VL	– Variáveis latentes

---

---

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	FASES DO CICLO CELULAR.....	26
FIGURA 2 –	PRINCÍPIO DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	54
FIGURA 3 –	TIPOS DE PRÉ-PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS UTILIZADOS EM ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS. (A) DADOS ORIGINAIS, (B) DADOS CENTRADOS NA MÉDIA E (C) AUTOESCALAMENTO.....	58
FIGURA 4 –	FÓRMULAS UTILIZADAS PARA CÁLCULO DA RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DE CALIBRAÇÃO (RMSEC) E RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DE PREVISÃO. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DE CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E PREVISÃO, RESPECTIVAMENTE.....	68
FIGURA 5 –	ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS POR DIMS A PARTIR DE DIFERENTES QUANTIDADES DE SORO SANGUÍNEO DE CAMUNDONGO SWISS: (A) 200 µL, (B) 100 µL E (C) 50 µL.....	73
FIGURA 6 –	ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS POR DIMS DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS 5 DIAS DA INOCULAÇÃO DO TE. AMOSTRAS PRECIPITADAS COM ACETONITRILA CONTENDO 0,1% TFA (v/v) E RESSUSPENSAS EM: (A) ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (50:50:1; v/v/v) E (B) ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (50:50:0,5; v/v/v).....	74
FIGURA 7 –	ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS POR DIMS DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGO SWISS APÓS 5 DIAS DA INOCULAÇÃO DO TE EHRlich. AMOSTRAS PRECIPITADAS COM ACETONITRILA CONTENDO 0,1% TFA (v/v) E RESSUSPENSAS EM: (A) ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (70:30:1; v/v/v) E (B) ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (70:30:0,5; v/v/v).....	75
FIGURA 8 –	ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR DIMS DE AMOSTRA DE SORO DE CAMUNDONGO SWISS APÓS 5 DIAS DA INOCULAÇÃO DO TE EHRlich. AMOSTRA PRECIPITADA COM ACETONITRILA CONTENDO 0,1% TFA (v/v) E RESSUSPENSA EM ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (70:30:0,1; v/v/v).....	76

---

---

FIGURA 9 –	ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR DIMS PARA A MISTURA ACETONITRILA/ÁGUA/ÁCIDO FÓRMICO (70:30:0,1) (v/v/v) (“BRANCO”).....	76
FIGURA 10 –	ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO ATRAVÉS DE DIMS PARA UMA AMOSTRA DE SORO PRECIPITADA COM ACETONITRILA.....	79
FIGURA 11 –	ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO ATRAVÉS DE DIMS PARA UMA AMOSTRA DE SORO PRECIPITADA COM SOLUÇÃO DE ACETONITRILA CONTENDO 0,1% (v/v) DE TFA.....	79
FIGURA 12 –	ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR DIMS PARA UMA AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO. (A) BALB-C GRUPO CONTROLE, (B) BALB-C APÓS 5 DIAS DE INOCULAÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH, (C) SWISS GRUPO CONTROLE E (D) SWISS APÓS 5 DIAS DE INOCULAÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH.....	80
FIGURA 13 –	GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS SWISS COLETADAS 5 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO TUMOR DE ERLICH: (A) AUTOESCALADO; (B) NÓRMALIZAÇÃO; (C) DADOS CENTRADOS NA MÉDIA...	82
FIGURA 14 –	GRÁFICO DE SCORES OBTIDOS PARA AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS BALB-C SADIOS (CONTROLES). AMOSTRAS CIRCULADAS SÃO REFERENTES AS DUPLICATAS.....	84
FIGURA 15 –	GRÁFICO DE <i>EIGENVALUES</i> VERSUS NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	86
FIGURA 16 –	GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS BALB-C OBTIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH: (A) 1 DIA, (B) 2 DIAS, (C) 3 DIAS E (D) 5 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO TE.....	88
FIGURA 16 – CONTINUAÇÃO	GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS BALB-C OBTIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH: (E) 7 DIAS E (F) 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO TE.....	89

---

---

FIGURA 17 –	GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS SWISS OBTIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRlich: (A) 3DIAS, (B) 5 DIAS, (C) 7 DIAS E (D) 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO TE.....	91
FIGURA 18 –	GRÁFICO DE SCORES OBTIDO PARA ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO TUMOR DE EHRlich EM CAMUNDONGOS SWISS.....	93
FIGURA 19 –	GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE SORO APÓS 3 DIAS DA INDUÇÃO DO TUMOR DE EHRlich: (A) BALB-C, <i>LOADINGS</i> DE CP3 E (B) SWISS, <i>LOADINGS</i> DE CP1.....	94
FIGURA 20 –	GRÁFICOS DE <i>LOADINGS</i> DAS AMOSTRAS COLETADAS DOS CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM O TUMOR DE ERlich: (A) 5 DIAS; (B) 7 DIAS E (C) 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TE.....	95
FIGURA 21 –	GRÁFICOS DE <i>LOADINGS</i> DAS AMOSTRAS COLETADAS DOS CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM O TUMOR DE ERlich: (A) 5 DIAS; (B) 7 DIAS E (C) 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TE.....	96
FIGURA 22 –	GRÁFICO DE RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM TE.....	98
FIGURA 23 –	GRÁFICO DE <i>LEVERAGE</i> <i>VERSUS</i> RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 8 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM TE.....	99
FIGURA 24 –	GRÁFICO DOS VALORES MEDIDOS <i>VERSUS</i> VALORES PREDITOS PLOTADO PARA VERIFICAR A CAPACIDADE DE PREDIÇÃO DAS PRÓPRIAS AMOSTRAS DO MODELO COM 8 VL EM CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM TE.....	100

---

---

FIGURA 25 –	GRÁFICO DE RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM TE.....	103
FIGURA 26 –	GRÁFICO DE <i>LEVERAGE</i> <i>VERSUS</i> RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 5 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM TE.....	104
FIGURA 27 –	GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS SWISS OBTIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO SARCOMA 180: (A) 3DIAS, (B) 5 DIAS, (C) 7 DIAS E (D) 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO S180.....	108
FIGURA 28 –	GRÁFICO DE LOADINGS DE CP1 OBTIDO PARA AS AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS 10 DIAS DA INDUÇÃO DO S180.....	109
FIGURA 29 –	GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> OBTIDO PARA AS AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS 3 DIAS DA INDUÇÃO DO S180. (A) <i>LOADINGS</i> DE CP1 E (B) <i>LOADINGS</i> DE CP2.....	110
FIGURA 30 –	GRÁFICO DE RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180.....	113
FIGURA 31 –	GRÁFICO DE <i>LEVERAGE</i> <i>VERSUS</i> RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 4 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180.....	114
FIGURA 32 –	GRÁFICO DE RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180. MODELO SEM AMOSTRAS ANÔMALAS 41 E 44.	117

---

---

FIGURA 33 –	GRÁFICO DE LEVERAGE VERSUS RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 4 VL OBTIDO APÓS REMOÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS 41 E 44 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180.....	118
FIGURA 34 –	GRÁFICO DE RMSECV VERSUS NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180. MODELO SEM AMOSTRAS ANÔMALAS 41, 44, 23 E 60.....	119
FIGURA 35 –	GRÁFICO DE LEVERAGE VERSUS RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 4 VL OBTIDO APÓS REMOÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS 23 E 60 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180.....	119
FIGURA 36 –	ESTRUTURA DOS REGIOISÔMEROS DE LISOFSOFATIDILCOLINAS (LPC) E PROPOSTA DE DISSOCIAÇÃO DE ALTA ENERGIA INDUZIDA POR COLISÃO NO MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO.....	124
FIGURA 37 –	ANÁLISE DE CLAE-EM OBTIDA PARA UMA AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO DE CAMUNDONGO BALB-C APÓS 7 DIAS DA INOCULAÇÃO COM TUMOR DE EHRLICH.....	126
FIGURA 38 –	ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 9,71 MINUTOS.....	127
FIGURA 39 –	EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE $m/z$ 520,4 $[M+H]^+$ ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	128
FIGURA 40 –	ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 11,4 MINUTOS.....	128
FIGURA 41 –	EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE $m/z$ 496,2 $[M+H]^+$ ATRAVES DE CLAE-EM/EM.....	129
FIGURA 42 –	EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE $m/z$ 518 $[M+Na]^+$ ATRAVES DE EM/EM (INFUSÃO DIRETA).....	130

---

---

FIGURA 43 –	EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE $m/z$ 546,4 $[M+Na]^+$ ATRAVÉS DE EM/EM (INFUSÃO DIRETA).....	131
FIGURA 44 –	ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 19,5 MINUTOS.....	131
FIGURA 45 –	EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE $m/z$ 546,6 $[M+H]^+$ ATRAVES DE CLAE-EM/EM.....	132
FIGURA 46 –	ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DAS FOSFATIDILCOLINAS...	133
FIGURA 47 –	ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 23,5 MINUTOS.....	133
FIGURA 48 –	EXPERIMENTO DE IONS PRODUTOS DO ION DE $m/z$ 758,2 $[M+H]^+$ ATRAVES DE CLAE-EM/EM.....	134
FIGURA 49 –	EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE $m/z$ 780,9 $[M+Na]^+$ ATRAVÉS DE EM/EM (INFUSÃO DIRETA).....	135

---

---

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIAS POR MEIO DE SELDI-TOF .....	39
TABELA 2 –	NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS INVESTIGADAS NA PCA REALIZADA PARA AS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS INOCULADAS COM CÉLULAS TUMORAIS DE EHRLICH. DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.....	87
TABELA 3 –	AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 29) TESTADO NO MODELO COM 8 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM TE.....	102
TABELA 4 –	AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 27) TESTADO NO MODELO COM 5 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM TE.....	105
TABELA 5 –	ÍONS DE MAIOR RELEVÂNCIA INDICADOS NAS ANÁLISES DOS GRÁFICOS DE <i>LOADINGS</i> OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS 5 E 7 DIAS DA INDUÇÃO DO S180.....	111
TABELA 6 –	AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 35) TESTADO NO MODELO 1 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180.....	115
TABELA 7 –	AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 35) TESTADO NO MODELO 2 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180.....	120
TABELA 8 –	COMPARAÇÃO ENTRE OS MODELOS 1 E 2 DE PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO S-180 EM CAMUNDONGOS SWISS.....	122
TABELA 9 –	IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DOS FOSFOLIPÍDIOS ENCONTRADOS NO SORO DOS CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS INOCULADOS COM TE E S180.....	137

---



---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	OBJETIVO GERAL	23
1.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	23
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	24
2.1	CÂNCER	24
2.2	SARCOMA 180	29
2.3	TUMOR DE EHRLICH	29
2.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	30
2.5	BIOMARCADORES	33
2.6	TECNOLOGIAS ÔMICAS	40
2.6.1	Metabonômica	42
2.6.2	Espectrometria de Massas aliada a quimiometria aplicada a estudos metabonômicos	44
2.6.3	Amostras utilizadas em Metabonômica	49
2.6.5	Interpretação dos dados metabolômicos	51
2.6.5.1	Análise de Componentes Principais (PCA)	53
2.6.5.2	Análise dos mínimos quadrados parciais (PLS)	55
2.6.5.3	Pré-processamento de dados	58
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	59
3.1	REAGENTES	60
3.2	ANIMAIS	60
3.3	CULTIVO DE CÉLULAS TUMORAIS	61
3.4	INDUÇÃO DOS TUMORES NOS CAMUNDONGOS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	62
3.5	PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS DE SORO	64
3.6	QUANTIDADE DE SORO UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES DE DIMS	64
3.7	PREPARO DAS AMOSTRAS	65
3.8	ANÁLISES POR INFUSÃO DIRETA NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	66
3.9	ANÁLISE QUIMIOMÉTRICAS	66
3.10	IDENTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES	68
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	70
4.1	OBTENÇÃO E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS	71
4.1.1	Quantidade de soro utilizado para as análises de DIMS	71
4.1.2	Precipitação das proteínas de alto peso molecular	77
4.2	PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE MASSAS ADQUIRIDOS PARA AS ANÁLISES QUIMIOMÉTRICA	80
4.3	DIAGNÓSTICO DO TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS UTILIZANDO DIMS-PCA	83
4.3.1	Gráficos de <i>scores</i> para os camundongos Balb-C inoculados com TE	88
4.3.2	Gráficos de <i>scores</i> para os camundongos Swiss inoculados com TE	90
4.3.3	Gráficos de Influências ( <i>loadings</i> ) para as linhagens Balb-C e Swiss inoculadas com Tumor de Ehrlich (TE)	93

---

---

4.3.4	Análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) para os camundongos Balb-C inoculados com TE.....	97
4.3.5	Análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) para os camundongos Swiss inoculados com Tumor de Ehrlich.....	103
4.4	DIAGNÓSTICO DO SARCOMA 180 EM CAMUNDONGOS SWISS UTILIZANDO DIMS-PCA.....	106
4.4.1	Análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) para os camundongos Swiss inoculados com S180.....	112
4.5	IDENTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES.....	123
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	138
6	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	141

---

---

# ***1. INTRODUÇÃO***

---

O câncer é considerado uma doença originada do descontrole do ciclo celular. A progressão do ciclo celular é um processo altamente ordenado e bem-regulado que envolve múltiplos mecanismos de regulação (*checkpoints*) os quais avaliam sinais de crescimento extracelular, tamanho da célula e integridade do DNA (PARK; LEE, 2003). Muitos estudos mostram que as mutações presentes em genes responsáveis pelo funcionamento do ciclo celular constituem a mudança genética mais comum em células neoplásicas. Sendo assim, podemos dizer que a principal característica que define as células cancerosas é a sua capacidade de divisão em condições anormais, produzindo células mutantes que adquirem independência dos sinais mitogênicos normalmente necessários para a progressão normal do ciclo celular (CLURMAN; ROBERTS, 1995). Portanto, compreender os mecanismos moleculares relacionados ao descontrole da progressão do ciclo celular em neoplasias pode fornecer importantes informações sobre como as células normais tornam-se cancerosas, bem como definir as possíveis estratégias de tratamento.

A estimativa mundial de casos incidentes de câncer para o ano de 2030 é de 27 milhões, sendo esperadas 17 milhões de mortes. No Brasil, a estimativa para o ano de 2012 é de cerca de 518 mil novos casos de câncer, sendo para homens as maiores incidências os de pele não melanoma (63 mil), próstata (60 mil), pulmão (17 mil), cólon e reto (14 mil) e estômago (13 mil) e para mulheres os de pele não melanoma (71 mil), mama (53 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (16 mil) e glândula tireóide (11 mil) (INCA, 2011).

Quando o câncer é diagnosticado de forma tardia, elevadas taxas de mortalidade são esperadas, o que leva o paciente a momentos de angústia, sofrimento e ansiedade, por associar a doença à morte. O tratamento pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou a combinação de mais de uma modalidade, porém o diagnóstico precoce ainda é o fator decisivo para o sucesso do tratamento da doença, bem como para aumentar a expectativa de sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes (INCA, 2011).

Diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas para aperfeiçoar os métodos de diagnóstico de neoplasias, dentre elas, a descoberta de biomarcadores indicativos da presença da doença (CHO, 2007; ZHANG, X. *et al.*, 2007). Os biomarcadores são importantes indicadores biológicos do estágio de uma doença e também da progressão do estado fisiopatológico de uma célula, sendo também

---

muito utilizados para garantir a eficácia e a segurança de novos agentes terapêuticos (CHO, 2007).

É conhecido que patologias como o câncer promovem alterações características de um ou mais metabólitos específicos em tecidos e/ou biofluidos corporais. Por este motivo, os biomarcadores podem ser detectados no soro ou plasma sanguíneo, lágrima, suor, saliva, líquido cefalorraquidiano dentre outros fluidos biológicos. Considerando que na maioria das vezes o diagnóstico do câncer é realizado por meio de biópsia, a detecção de neoplasias por meio de biomarcadores em fluidos biológicos é extremamente atrativa, uma vez que podem possibilitar um diagnóstico rápido da doença sem a necessidade de procedimentos invasivos (VEENSTRA *et al.*, 2005).

A descoberta de biomarcadores para o diagnóstico precoce de neoplasias tem sido objeto de estudo das tecnologias ômicas, como por exemplo, a genômica, proteômica e a metabonômica (ZHANG, X. *et al.*, 2007). Dentre estas, a metabonômica é sugerida como a tecnologia que provê a maior informação funcional de um sistema biológico uma vez os produtos finais dos processos de regulação celular são metabólitos. Sendo assim, tanto a presença destes metabólitos quanto seus níveis podem ser considerados a melhor resposta do organismo frente a mudanças genéticas e ambientais (FIEHN, 2002) (RYAN; ROBARDS, 2006).

Muitas vantagens vêm sendo descritas na identificação de patologias através do uso das estratégias metabonômicas, dentre as quais um custo relativamente barato de análise com uma aquisição analítica consideravelmente rápida. Além disso, o uso de estratégias metabonômicas permite comparar o metaboloma de uma espécie com outra, pois ao contrário dos genes e das proteínas os metabólitos são conservados entre diferentes espécies (GRIFFIN; SHOCKCOR, 2004).

As principais ferramentas analíticas utilizadas em estudos metabonômicos são ressonância magnética nuclear (RMN) e as cromatografias gasosa e líquida de alta eficiência acopladas a espectrometria de massas (CG-EM e CLAE-EM), cada uma com suas vantagens e desvantagens (GRIFFIN; SHOCKCOR, 2004). Como exemplo, podemos citar o fato de que a técnica de RMN não utiliza etapas de pré-tratamento das amostras com vantagem adicional de fornecer análises não destrutivas; porém esta técnica apresenta baixa sensibilidade e resolução que,

---

somado a uma restrita faixa de concentração das amostras, resulta na detecção apenas de metabólitos de média a alta abundância (WANT *et al.*, 2006). Por outro lado, estratégias analíticas baseadas em CG e CLAE-EM são mais sensíveis e seletivas que RMN (GRIFFIN; SHOCKCOR, 2004), pois além de utilizarem separação cromatográfica, os metabólitos são detectados especificadamente de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ).

Em particular, a infusão direta por espectrometria de massas (DIMS) é uma técnica que vem sendo utilizada como uma ferramenta promissora na detecção de biomarcadores. Além disso, por meio desta técnica é possível obter *screenings* rápidos, sensíveis e reprodutíveis ou ainda realizar estudos de classificação de amostras (*metabolic fingerprinting*) (SMEDSGAARD; FRISVAD, 1996; DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007; ELLIS *et al.*, 2007; BEDAIR; SUMNER, 2008).

Independente da ferramenta analítica utilizada para análise de metabólitos, uma grande quantidade de dados é gerada, dificultando a identificação de padrões que mostrem as reais diferenças entre indivíduos saudáveis e pacientes com uma doença complexa. Para atender a estas dificuldades, análises quimiométricas vêm sendo utilizadas no sentido de extrair informações de dados químicos multivariados; dentre elas a análise de componentes principais (PCA) vem sendo utilizada especialmente para reduzir a dimensionalidade dos dados sem a perda de informações relevantes (SCHOLZ *et al.*, 2004; ISSAQ *et al.*, 2009; MADSEN; LUNDSTEDT; TRYGG, 2010).

Sob todos os aspectos, a técnica de infusão direta por espectrometria de massas associada a análise quimiométrica (DIMS-PCA) pode ser utilizada promissora para a classificação de amostras e busca de biomarcadores para neoplasias. Tendo em vista que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura que utilizam a espectrometria de massas para a descoberta de biomarcadores e diagnóstico de neoplasias tem sido produzidos utilizando equipamentos de alta resolução, o presente trabalho investiga a possibilidade de utilizar a técnica de DIMS-PCA, utilizando um espectrômetro de massas de baixa resolução, para identificar possíveis alterações ocorridas no perfil metabólico de camundongos inoculados com células tumorais de Ehrlich e Sarcoma 180 com o intuito de um possível diagnóstico precoce destas neoplasias.

---

---

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar a técnica de infusão direta por espectrometria de massas (DIMS) associada a análise quimiométrica para obter o diagnóstico precoce de neoplasias, utilizando como modelo camundongos inoculados com células tumorais de Ehrlich e Sarcoma 180.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a – Inocular as células tumorais de Ehrlich e Sarcoma 180 em camundongos Swiss e Balb-C para o desenvolvimento de neoplasias e coletar amostras de sangue dos animais por meio de punção cardíaca para obtenção do soro sanguíneo.
  - b – Adquirir espectros de massas a partir de amostras de soro sanguíneo de camundongos inoculados as células tumorais de Ehrlich e Sarcoma 180 e por meio de análises de componentes principais (PCA) verificar a possível discriminação entre os grupos controle (sadios) e experimental (câncer induzido).
  - c – Aplicação de Análises de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) sobre os espectros de massas adquiridos para a construção de modelos de predição de novas amostras em relação a estágios de desenvolvimento da doença (em dias).
  - d – Analisar as amostras via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) para uma possível identificação dos metabólitos que permitiram a diferenciação entre os grupos controle e experimental.
-

---

## ***2. REVISÃO DA LITERATURA***

---



## 2.1 CÂNCER

A primeira teoria sobre o câncer foi articulada por Hippocrates (460-370 A.C.) que postulou que a doença era devida a um excesso de bile negra no organismo. Esta hipótese foi aceita até a época do Renascimento quando uma dissecação anatômica feita por Andreas Vesalius e colaboradores mostrou a inexistência da bile negra (WEINSTEIN; CASE, 2008). Outra hipótese para o surgimento da doença surgiu no ano de 1700, a qual postulava que o câncer era proveniente da linfa coagulada. A era moderna da pesquisa do câncer, começou somente no século XIX e levou ao atual conceito desenvolvido por vários investigadores, especialmente Rudolf Virchow, de que o câncer é uma doença das células (WEINSTEIN; CASE, 2008).

Para compreender o câncer, é necessário compreender o ciclo normal de divisão celular e o que acontece quando as células normais tornam-se células cancerosas. A divisão celular consiste na replicação do DNA e a divisão dos cromossomos replicados em duas células. Originalmente a divisão celular compreende a mitose (M), ou seja, o processo de divisão nuclear que é dividido em fases chamadas de prófase, metáfase, anáfase e telófase; e a fase de intérfase (intervalo entre duas fases de mitose) a qual inclui as fases G1, S e G2. A replicação do DNA ocorre na fase S da intérfase. Esta fase S é precedida por um espaço chamado G1, durante o qual a célula se prepara para a síntese de DNA, e é seguido por um espaço chamado G2, durante o qual a célula se prepara para a mitose. As fases de G1, S, G2 e M são as subdivisões tradicionais do ciclo celular padrão (Figura 1). Células em G1 podem, antes da replicação do DNA, entrar em um estado de repouso chamado G0. Estas células em G0 são em grande parte responsáveis pelas células do corpo humano que não crescem e não proliferam (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

---



em pontos específicos do ciclo celular, isto é CDK4, CDK2 e CDK6 durante G1, CDK2 durante a fase S e CDK1 durante as fases G2 e M (PARK; LEE, 2003; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Em condições normais, os mecanismos reguladores do crescimento celular mantêm a homeostase celular, ou seja, eles regulam o equilíbrio entre a proliferação celular, cessar o crescimento e a morte programada (apoptose) (MOLINARI, 2000). No entanto, mutações no DNA das células podem ocorrer e produzir um descontrole do ciclo celular causando o aparecimento dos tumores. Estas mutações são decorrentes da ação de algum fator ambiental ou intrínsecas de células predispostas a lesões genéticas. Normalmente, os mecanismos de controles detectam os danos celulares e promovem a eliminação das células mutantes. A destruição das células danificadas pode ocorrer por necrose ou apoptose. A necrose caracteriza-se por um inchaço celular e rápida degeneração enquanto na apoptose ocorre uma retração das células com formação de vesículas de membrana plasmática e fragmentação do DNA. Portanto, após ocorrerem danos ao DNA, a morte das células por apoptose (morte programada) é uma via importante na prevenção da proliferação de células mutantes (FOSTER, 2008).

A perturbação do equilíbrio entre a proliferação, crescimento celular e a apoptose, pode resultar em hiperplasia ou neoplasia. O processo de hiperplasia (aumento do número de células em um órgão ou tecido) é reversível, uma vez que o estímulo seja removido, porém, o processo de neoplasia (proliferação celular anormal, sem controle, autônoma) é irreversível, ou seja, as células neoplásicas são caracteristicamente independentes do estímulo de crescimento devido a mutações das vias de sinalização intracelulares (FOSTER, 2008).

O descontrole do ciclo celular associado a neoplasias ocorre através de mutações em genes especiais denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela transformação das células normais. As células diferentes são, então, denominadas cancerosas ou tumorais. Outro tipo de gene que desempenha um papel importante no desenvolvimento de neoplasias são os genes supressores de tumores. Em neoplasias, as mutações têm sido observadas em genes que codificam para as proteínas CDK, ciclinas, enzimas ativadoras de CDK e substratos para CDK (FOSTER, 2008).

---

O Instituto Nacional de Câncer (INCA), órgão auxiliar do Ministério da Saúde no desenvolvimento e coordenação das ações integradas para a prevenção e o controle do câncer no Brasil, define a doença como sendo células anormais que se dividem descontroladamente no organismo sendo capazes de invadir outros tecidos por meio da circulação sanguínea ou sistema linfático (INCA, 2011).

A maioria dos cânceres é nomeada de acordo com sua origem (órgão ou tipo de célula). Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma (INCA, 2011).

Nem todos os tumores são cancerígenos, eles podem ser benignos ou malignos. Os tumores benignos não são cancerosos e não se propagam para outras partes do corpo, ou seja, podem frequentemente ser removidos e, na maioria dos casos, não retornam. Do contrário, os tumores malignos são cancerosos e podem invadir tecidos adjacentes e se difundir para outras partes do corpo (metástase). Em outros casos, alguns tipos de câncer como a leucemia (câncer da medula óssea e sangue) não formam tumores (NCI, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2030, haverá cerca de 27 milhões de casos incidentes de câncer, sendo esperados 17 milhões de mortes por esta doença (INCA, 2011). Diante desse cenário, fica evidente a necessidade da continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como na promoção da saúde, na detecção precoce da doença, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS). Neste sentido, uma vez que a detecção precoce de neoplasias é essencial para o sucesso do tratamento e melhora da qualidade de vida do paciente, a detecção de moléculas que tem sua concentração alterada ou até mesmo que surgem em função da doença, denominadas biomarcadores, é de significativa importância para o diagnóstico destas doenças.

---

---

## 2.2 SARCOMA 180

O Sarcoma 180 (S180) foi descoberto em 1914 apresentando-se como uma massa sólida na região axilar de um camundongo. Inicialmente o S180 foi classificado como carcinoma mamário, porém após vários transplantes por via subcutânea, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram característicos de um sarcoma.

O S180 tem sido utilizado em estudos histopatológicos e de atividade antitumoral de novas drogas, pois cresce rapidamente em 90% dos casos, regredindo em 8 a 10%, e desenvolve-se em todas as populações de camundongos (ASSEF *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2005; DE PAULA MACHADO; MELO-JUNIOR, 2009). Alguns estudos utilizam este tipo de tumor para efeitos comparativos com outros tipos de tumor, tais como tumor ascítico de Ehrlich e adenocarcinoma 755 (GRAFF *et al.*, 1952; METTLER; CLARKE; CASALS, 1982).

## 2.3 TUMOR DE EHRLICH

O tumor de Ehrlich (TE) é uma neoplasia experimental transplantável gerada a partir de um epitélio maligno, que corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas (SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006). Tumores experimentais transplantados tem sido usados em estudos físicos, químicos, virais e carcinogênicos hormonais (FREITAS *et al.*, 2006).

Quando inoculado por via intraperitônea este tumor cresce de uma forma ascítica, ou seja, as células tumorais crescem no líquido peritoneal, e quando inoculado por via subcutânea, cresce na forma de um tumor sólido (FREITAS *et al.*, 2006; OZASLAN *et al.*, 2011). As vantagens da utilização de neoplasias transplantáveis, está relacionada com o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais bem como com o tempo de estudo, o

---

qual fica minimizado devido ao desenvolvimento rápido da neoplasia (OZASLAN *et al.*, 2011).

O tumor ascítico de Ehrlich é referenciado como um carcinoma indiferenciado, hiperdiplóide, com alta capacidade transplantável, de rápida proliferação e sem regressão, com 100% de malignidade e não possui um antígeno de transplante tumor-específico. Após a inoculação das células na cavidade intraperitoneal do animal, a proliferação ocorre em duas fases: a primeira onde o número de células aumenta exponencialmente (fase de proliferação) e a segunda, onde o crescimento permanece praticamente constante, seguida de uma fase de descanso (fase de platô). Mudanças morfológicas e metabólicas ocorrem durante a transição das células ascíticas de Ehrlich de uma fase para outra, entre elas deterioração estrutural, diminuição do número de mitocôndrias, decréscimo da biossíntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), perda de nucleotídeos intracelulares (purina e pirimidina), nucleosídeos e bases. O acúmulo de fluido ascítico ocorre em paralelo com a proliferação celular e, após um determinado período, o animal morre pela pressão exercida pelo tumor e/ou pelos danos resultantes deste tumor (OZASLAN *et al.*, 2011).

## 2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica relacionada a medida de massa empregada para identificação e quantificação de compostos químicos. Nesta técnica, o peso molecular dos metabólitos intactos (relacionado com a composição elementar) e o padrão de massas dos metabólitos fragmentados (relacionado à estrutura química) são determinados (ELLIS *et al.*, 2007).

Do ponto de vista analítico, a espectrometria de massas se destaca com grandes vantagens em relação às demais técnicas quantitativas, pois provê alta sensibilidade (detecção na ordem de pmol/L) e seletividade (detecção de compostos com certa especificidade), além de contribuir na identificação de substâncias sem a necessidade de extensiva preparação de amostras (ELLIS *et al.*, 2007).

Os espectrômetros de massas comercialmente disponíveis operam com estratégias similares de análises, e basicamente consistem das seguintes partes (DASS, 2007):

- a) Fonte de ionização, que adiciona ou remove um elétron ou próton às moléculas convertendo-as em íons gasosos;
- b) Analisador de massas, que utiliza campos magnéticos e/ou elétricos para separar e controlar a locomoção dos íons em relação às suas razões massa/carga ( $m/z$ ) e;
- c) Detector, que amplifica a corrente de íons que foram selecionados no analisador de massas.

Existem diferentes tipos de fontes de ionização, porém algumas técnicas de ionização brandas operam em pressão atmosférica, com grande rapidez, sensibilidade de picomol até fentomol, seletividade e mínimo preparo de amostra. As técnicas de ionização brandas mais utilizadas para análise de substâncias de médio e baixo peso molecular são as técnicas API (*Atmospheric Pressure Ionization*), principalmente ESI (*Electrospray Source Ionization*), APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e APPI (*Atmospheric Pressure Photo Ionization*). No entanto, ESI é a mais utilizada (THOMSON; DAVIDSON; LOVETT, 1980; YAMASHITA; FENN, 1984; WHITEHOUSE *et al.*, 1985; FENN *et al.*, 1989; ROBB; COVEY; BRUINS, 2000; TAKATS *et al.*, 2004; HADDAD; SPARRAPAN; EBERLIN, 2006).

ESI opera à pressão atmosférica e utiliza um capilar que recebe uma diferença de potencial entre 500-5.500V. Os solutos presentes em uma solução são transferidos como íons para uma fase gasosa (ionizados) por meio de protonação ou desprotonação ou ainda pela adição de outros átomos como sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ), formando adutos. Em seguida, eles são separados (de acordo com a  $m/z$ ) e por fim detectados (GLISH; VACHET, 2003). As espécies observadas são chamadas de protonadas  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , desprotonadas  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ou de íons aduto de sódio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ou de potássio  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , por exemplo (DASS, 2007).

Nas técnicas de ionização brandas pouca ou nenhuma informação estrutural é fornecida, pois os íons formados possuem baixa energia interna o que resulta em espectros de massas com sinais relativos a moléculas protonadas e desprotonadas com pouca ou nenhuma informação a respeito de íons fragmentos. Por este motivo, ocorreu o desenvolvimento de técnicas de fragmentação induzidas como, por

---

exemplo, a espectrometria de massas sequencial (*tandem*) – EM/EM. Nesta, os fragmentos são geralmente produzidos por meio da dissociação induzida por colisão (CID – *Collision-Induced Dissociation*), ou seja, colisão do íon gerado na fonte de ionização com uma molécula de gás em uma câmara de colisão (DASS, 2007).

ESI vem sendo acoplado com sucesso a diversos tipos de analisadores, que por sua vez possuem características e aplicações ímpares, bem como seus benefícios e suas limitações. A escolha do analisador de massas, portanto, deve ser baseada de acordo com a aplicação, custo e desempenho desejados, uma vez que um sistema universal com múltiplas finalidades não existe (HO *et al.*, 2003; MANISALI; CHEN; SCHNEIDER, 2006; KEBARLE; VERKERK, 2009).

Outras técnicas de ionização muito conhecidas e empregadas são as técnicas que utilizam dessorção, incluindo ionização por dessorção a laser em matriz assistida (MALDI) e ionização por dessorção a laser em superfície melhorada (SELDI). Ambas geralmente utilizam o analisador tempo de voo (TOF), descrito logo a seguir. Na técnica de MALDI, a amostra é co-cristalizada em uma matriz a qual absorve energia proveniente do laser. A matriz ionizada, portanto, transfere prótons para a amostra a qual volatiliza juntamente com a matriz e segue em direção ao analisador (VAN BRAMER, 1997). Na SELDI, a amostra é aplicada sobre uma superfície contendo um ligante químico que pode ser aniônico, catiônico, hidrofóbico, anticorpos, entre outros. Algumas proteínas da amostra se ligam à superfície, enquanto os outros são removidos por lavagem. Após a lavagem da amostra, uma matriz é aplicada sobre a superfície a qual se cristaliza com os peptídeos da amostra. Como no MALDI, um laser ioniza a matriz e consequentemente a amostra é direcionada ao detector (ISSAQ *et al.*, 2002).

Dentre os analisadores existentes estão os de captura [*ion trap*, tempo de voo (TOF) e ressonância ciclotrônica de íons (ICR)], onde os íons são armazenados dentro do analisador através de um campo eletromagnético podendo então ser injetados para outra fonte externa de íons; e os analisadores de transmissão (quadrupolos), onde os íons deixam a fonte de ionização e são transmitidos até o detector através de um campo eletromagnético (VAN BRAMER, 1997; GLISH; VACHET, 2003).

Os quadrupolos (Q) consistem de quatro barras cilíndricas paralelas e utilizam um campo elétrico para separar os íons, ou seja, a análise das massas é em



função de radiofrequência e corrente direta aplicadas às barras. Como resultado somente íons de certa relação  $m/z$  poderão alcançar o detector para uma dada razão de tensões. Outros íons terão uma trajetória instável ao longo das barras e irão colidir com as mesmas (GLISH; VACHET, 2003).

A grande vantagem de utilizar quadrupolos está nos recursos de análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas *tandem* (EM-EM). Nestes, dois quadrupolos estão dispostos em séries sequenciais. Íons de particular massa/carga (precursores) são selecionados no primeiro quadrupolo sendo direcionados para uma câmara de colisão, onde se chocam com um gás inerte formando os íons fragmentos que em seguida são direcionados até o detector. Fragmentos dos íons são característicos para cada classe de compostos, portanto a especificidade da detecção aumenta e consequentemente a classe da molécula precursora pode ser definida (DOOLEY, 2003; DREXLER; FEYEN; SANDERS, 2004; MOCO *et al.*, 2007).

Após a passagem dos íons pelo analisador estes são transmitidos até o detector. Vários tipos de detectores para espectrômetros de massas estão disponíveis no mercado sendo o mais comum o multiplicador de elétrons o qual gera um sinal através da formação de elétrons secundários que são amplificados. Os critérios mais importantes que distinguem diferentes tipos de detecção de íons são a sensibilidade, a precisão e o tempo de resposta. Um multiplicador de elétrons, por exemplo, apresenta resposta rápida em sistemas acoplados a cromatografia, permitindo varreduras de massas de 50-500 Da em 0,1 segundo (SIUZDAK, 1996).

## 2.5 BIOMARCADORES

É conhecido que patologias como neoplasias promovem alterações características de um ou mais metabólitos específicos em tecidos e/ou biofluidos corporais. Estas substâncias são denominadas de marcadores tumorais ou biomarcadores os quais são importantes indicadores biológicos do estágio de uma

doença e também da progressão do estado fisiopatológico de uma célula (CHO, 2007).

As células tumorais sintetizam e secretam substâncias bem como peptídios e proteínas que podem, eventualmente, atingir a corrente sanguínea podendo, portanto, serem detectadas (marcadores tumorais convencionais). Os marcadores tumorais convencionais são então aqueles estabelecidos pela medição dos peptídios derivados do tumor ou secretados por ele ou ainda pela determinação da concentração de algumas proteínas específicas presentes no soro dos pacientes. Por exemplo, a detecção de níveis circulantes de  $\alpha$ -fetoproteína identificam pacientes com câncer de fígado, enquanto a presença de níveis elevados de proteínas específicas secretadas pelos tumores como o antígeno carcinoembrionário e o antígeno prostático específico (PSA) caracterizam o diagnóstico das neoplasias de mama e próstata, respectivamente. Neste sentido, estas proteínas podem ser consideradas como parte do perfil sérico dos pacientes contendo o câncer e contribuem para o perfil proteico tumor-específico destes pacientes (EBERT *et al.*, 2006).

Portanto, os conceitos de biomarcadores os definem como substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente pelo tumor ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor (EISENBERG; KOIFMAN, 2001). Incluem antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios sendo que a principal utilidade em medicina clínica tem sido em testes laboratoriais para apoiar o diagnóstico. Alguns marcadores tumorais também são valiosos para determinar a resposta ao tratamento e indicar a ocorrência de recidivas durante o período de acompanhamento (MATOS *et al.*, 2005). É importante que esta substância possa ser utilizada para diferenciar tecidos normais de neoplásicos e que possa ser caracterizada ou quantificada por procedimentos relativamente práticos (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

Os biomarcadores são produzidos por órgãos específicos do corpo ou por tumores e, portanto, quando detectados em quantidades acima do normal, são sugestivos da presença de um tumor (VEENSTRA *et al.*, 2005). Por exemplo, um dos biomarcadores mais conhecidos é o PSA, o qual é produzido em pequenas quantidades por células normais da próstata. Porém, altas quantidades de PSA no

---

soro, é um indicativo da existência de câncer de próstata (KURUMA *et al.*, 2005). Outro biomarcador conhecido é o antígeno de câncer 125 (CA125), característico do surgimento de câncer de ovário (BARON *et al.*, 2005; RIEDINGER *et al.*, 2006). Importante mencionar que para realizar o diagnóstico precoce de neoplasias, são necessários biomarcadores sensíveis e específicos, ou seja, uma substância presente no tumor ou nos fluidos biológicos, indicativa do progresso ou do status da doença (ZHANG, X. *et al.*, 2007).

Os requisitos a serem cumpridos por um biomarcador para que ele facilite o diagnóstico de neoplasias e melhore o prognóstico da doença são os seguintes (EBERT *et al.*, 2006):

1. Ser passível de sensibilidade e especificidade para a detecção de neoplasias em uma fase precoce ou detecção de lesões precursoras;
2. Ser de fácil acesso e não invasivo presente em biofluidos tais como plasma, soro ou outros;
3. Ser de determinação rápida, reprodutível e de baixo custo; e
4. Ter a capacidade de permitir uma estratégia de tratamento.

Existem três tipos de biomarcadores para neoplasias: prognóstico, preditivo e farmacodinâmico. Os biomarcadores prognósticos permitem prever o curso natural de um câncer, ou seja, indicam se o resultado para o paciente é bom ou ruim orientando, portanto a decisão de quem irá tratar ou o quão agressivamente irá tratar. Exemplos destes biomarcadores incluem alguns testes de expressão gênica para uso clínico em diagnóstico de câncer de mama os quais estimam a probabilidade do câncer de mama inicial recorrer após remoção por cirurgia. Estes testes de expressão multigênica podem então ser utilizados para decidir quem deve receber terapia sistêmica para eliminar quaisquer células de tumor remanescente. Os biomarcadores preditivos (ou de resposta) são utilizados para avaliar a probabilidade de um paciente se beneficiar quando fizer uso de um tratamento particular. Por exemplo, pacientes com câncer de mama em que o gene ERBB2 (também conhecido como HER2 ou NEU) é amplificado se beneficiam quando são tratados com o medicamento Trastuzumab (Herceptin), enquanto que quando o gene que codifica o receptor de estrogênio é expresso pelo tumor, os pacientes respondem melhor ao tratamento com Tamoxifen. Já os biomarcadores

---

farmacodinâmicos medem os efeitos a curto prazo de uma droga no tumor (ou sobre o hospedeiro) e podem ser utilizados para orientar a seleção de doses nas fases iniciais do desenvolvimento clínico de um novo medicamento anti-neoplásico (SAWYERS, 2008).

Existem diversas abordagens disponíveis para uma possível identificação de compostos capazes de funcionar como um biomarcador. Uma estratégia simples seria a comparação do perfil metabólico de um indivíduo sadio com o perfil de um indivíduo com uma doença definida. Uma vez que a resposta do organismo a uma condição fisiopatológica é refletida por uma mudança no perfil metabólico de uma amostra biológica como sangue, urina, tecidos ou células, a aplicação de uma técnica de detecção adequada e altamente reprodutível, permite então detectar as diferenças entre estes perfis metabólicos (DREXLER; FEYEN; SANDERS, 2004).

A Espectrometria de Massas (EM) é uma técnica analítica de elevada sensibilidade e especificidade e por este motivo adequada para a descoberta de um biomarcador. A hipótese central desta abordagem é baseada no fato que proteínas ou fragmentos de proteínas produzidos por células cancerosas ou o seu microambiente podem, eventualmente, entrar na circulação. Em seguida, a concentração (abundância) destas proteínas /fragmentos podem ser analisados por espectrometria de massas e utilizado para fins de diagnóstico, em combinação com um algoritmo matemático (PETRICON *et al.*, 2002). No entanto, devido a natureza complexa das amostras a serem analisadas, existem importantes desafios analíticos, por exemplo, em alguns casos, os biomarcadores de interesse podem estar presentes em baixos níveis e mascarados por uma alta concentração de outras biomoléculas. Portanto, estes biomarcadores necessitam de algum tipo de isolamento ou amplificação antes da detecção por espectrometria de massas. Além disso, os biomarcadores podem ser classificados como aminoácidos, lípidos, esteróides, peptídeos e proteínas, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, ou seja, a diversidade de propriedades físico-químicas existentes também significam desafios analíticos para a descoberta de biomarcadores (DREXLER; FEYEN; SANDERS, 2004). Por exemplo, considerando a tentativa de identificar uma proteína que é produzida pela presença de um tumor maligno de mama com um tamanho médio de 21 e 16 mm, estas dimensões corresponderiam a tumores com volumes entre 4.000 e 9.000 mm<sup>3</sup>, aproximadamente. Considerando que o volume médio corpóreo de

---

uma mulher é de cerca de  $1,5 \times 10^8 \text{ mm}^3$ , o tumor representaria menos de 0,006% do volume total corporal. Além disso, uma vez que muitas tecnologias tentam identificar a presença de tumores específicos por meio de biomarcadores no sangue, onde mais de 60.000 km de vasos sanguíneos formam o sistema circulatório e ainda sendo as amostras de sangue obtidas a partir de um local que é distinto do local do tumor, é fácil prever porque a identificação de uma proteína que é específica para uma neoplasia é tão difícil (VEENSTRA *et al.*, 2005).

Muitos trabalhos realizados com objetivo de encontrar um biomarcador foram feitos utilizando a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Estes trabalhos comparam e identificam diferenças nos padrões de expressão de proteínas entre amostras de indivíduos doentes e normais. Após a eletroforese, as proteínas de interesse são removidas do gel (digeridas proteoliticamente ou quimicamente) e identificadas por EM. Apesar da 2D-PAGE proporcionar uma excelente resolução, a necessidade de manuseio subsequente da amostra limita a sensibilidade geral do método. Por este motivo, muitos trabalhos foram realizados objetivando a descoberta de biomarcadores por meio da EM que utiliza a ionização por dessorção a laser em superfície melhorada utilizando analisador por tempo de voo (SELDI-TOF). Esta técnica combina cromatografia e EM, ou seja, as proteínas são retidas em uma superfície por meio de cromatografia e subsequentemente ionizadas e detectadas por EM utilizando analisador do tipo tempo de voo (TOF). Os tipos de neoplasias que foram examinadas por SELDI-TOF incluem ovário, próstata, mama, bexiga e renal, e os fluidos biológicos analisados incluem urina, soro e liquor. Em geral, tem sido sugerido que esta tecnologia pode alcançar maior sensibilidade e especificidade diagnóstica (próximo dos 100%). Além disso, o sistema é mais eficaz para proteínas de baixo peso molecular (isto é, menores que 20 kDa), fornecendo uma técnica de visualização complementar ao 2D-PAGE. Portanto, a espectrometria de massas utilizando SELDI-TOF é mais sensível, e requer menores quantidades de amostra do que 2D-PAGE (ISSAQ *et al.*, 2002). A Tabela 1 mostra algumas proteínas descobertas por SELDI-TOF e identificadas como biomarcadores.

Apesar das células tumorais sintetizarem e secretarem substâncias bem como peptídeos e proteínas que podem ser detectados, o crescimento invasivo das células tumorais é caracterizado pelo desenvolvimento de um estroma desmoplásico

---

(crescimento do tecido fibroso ou conjuntivo que invade células saudáveis) e uma resposta inflamatória local promovida pela invasão do tumor. Devido a este crescimento, ocorre uma elevada atividade proteolítica local e alterações metabólicas e imunológicas específicas que modificam o proteoma do soro. Portanto, podemos dizer que a determinação de proteínas específicas presentes no soro combinada com a detecção das alterações metabólicas tumorais permite uma melhora significativa na capacidade de detecção precoce do câncer, comparativamente a utilização somente dos marcadores convencionais (EBERT *et al.*, 2006). Uma vez que a maioria das estratégias disponíveis para detecção de neoplasias necessitam de procedimentos invasivos (biópsia) para obtenção de amostras podemos dizer que o diagnóstico do câncer baseado na descoberta de biomarcadores presentes no perfil proteico sérico pode permitir a identificação de pacientes com câncer de uma forma rápida, reprodutível, não invasiva e de baixo custo com uma alta sensibilidade e especificidade (SRINIVAS *et al.*, 2002). Neste sentido, a aplicação de tecnologias chamadas “ômicas” como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabonômica em amostras de tecidos e fluidos corporais vem sendo o foco das pesquisas científicas com o objetivo de estabelecer biomarcadores para o diagnóstico precoce de neoplasias (ZHANG, X. W. *et al.*, 2007).

---

TABELA 1 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIAS POR MEIO DE SELDI-TOF

Tipo de Neoplasia	Amostra	Peso molecular do biomarcador (Da)	Identificação do biomarcador	Referência
OVÁRIO	Soro	11700	Fragmento Hpt $\alpha$	(YE <i>et al.</i> , 2003)
		28043	Apolipoproteína A-I	(ZHANG <i>et al.</i> , 2004)
		12828	Transtiretina N-terminal	
		3272	Fragmento ITIH4	
		12,9 x 10 <sup>3</sup>	Transtiretina N-terminal	(KOZAK <i>et al.</i> , 2003; KOZAK <i>et al.</i> , 2005)
		13,9 x 10 <sup>3</sup>	Transtiretina	
		15,9 x 10 <sup>3</sup>	Cadeia $\beta$ de hemoglobina	
		28 x 10 <sup>3</sup>	Apolipoproteína A-I	
		79 x 10 <sup>3</sup>	Transferrina	(WOONG-SHICK <i>et al.</i> , 2005)
		15,1 x 10 <sup>3</sup>	Cadeia $\alpha$ de hemoglobina	
		15,8 x 10 <sup>3</sup>	Cadeia $\beta$ de hemoglobina	
SEIO	Aspirado de mamilo	9,2 x 10 <sup>3</sup>	Fragmento de Haptoglobina	(RAI <i>et al.</i> , 2002)
		54 x 10 <sup>3</sup>	Cadeia pesada de imunoglobulina	
		79 x 10 <sup>3</sup>	Transferrina	
	Soro	8000	[Cadeia $\beta$ de hemoglobina] <sup>+2</sup>	(SAUTER <i>et al.</i> , 2005)
		15940	Cadeia $\beta$ de hemoglobina	
		31770	Dímero de cadeia $\beta$ de hemoglobina	
		8,1 x 10 <sup>3</sup>	Truncamento C-terminal da anafilatoxina C3a	(LI <i>et al.</i> , 2005)
		8,9 x 10 <sup>3</sup>	Anafilatoxina C3a livre de arginina	
		7790	Cininogênio de alto peso molecular	(HEIKE <i>et al.</i> , 2005)
		9285	Isoforma de apolipoproteína A-II	
PRÓSTATA	Soro	8946	Isoforma de apolipoproteína A-II	(MALIK <i>et al.</i> , 2005)
		11488	Isoformas de amilóide sérica-1	(LE <i>et al.</i> , 2005)
		11573		
		11639		
		11680		
RENAL	Soro	9200	Haptoglobina $\alpha$ -1	(TOLSON <i>et al.</i> , 2004)
		11144	Amilóide sérica-1 livre de arginina, serina e fenilalanina	
		11432	Amilóide sérica-1 livre de arginina e serina	
		11518	Amilóide sérica-1 livre de arginina	
		11683	Amilóide sérica-1	

---

## 2.6 TECNOLOGIAS ÔMICAS

A busca por marcadores biológicos para a detecção precoce de uma doença promoveu avanços na instrumentação analítica nas últimas décadas permitindo a análise de uma diversidade biológica de compostos, tais como DNA (genômica), RNA (transcriptômica), proteínas (proteômica) e pequenas moléculas (metabonômica) (ZHANG, X. *et al.*, 2007; ISSAQ *et al.*, 2009).

Os campos da genômica, transcriptômica e proteômica há muito tempo desenvolvem tecnologias que permitem a análise de resposta do organismo a uma perturbação. No entanto, ferramentas para análises metabonômicas surgiram substancialmente a partir do ano de 2004, demonstrando que este campo é adequado para estudar um fenótipo ou as mudanças em um fenótipo provenientes de influências ambientais, doenças ou alterações no próprio genótipo (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007).

As amostras biológicas analisadas por meio das tecnologias ômicas incluem sangue, urina, escarro, saliva, lágrima, líquido e amostras de tecidos, entre outras. A presença de muitos componentes nestas amostras como por exemplo, aminoácidos, peptídeos, proteínas ou metabólitos tornam a análise destas amostras muito complexas. Uma breve comparação entre as principais tecnologias ômicas é descrita a seguir.

O transcriptoma é o conjunto completo dos produtos do RNA transcrito (RNA<sub>t</sub>) em um dado organismo, e a transcriptômica é o estudo do transcriptoma. A tecnologia de “*microarray*” é uma das ferramenta para análise transcriptômica que tem sido utilizada para identificar biomarcadores associados com alguns tipos de tumor. Além disso, os padrões de expressão do gene podem ser utilizados para classificar os tipos de tumores e prever o resultado (ZHANG, X. W. *et al.*, 2007).

A proteômica é a identificação e caracterização de todas as proteínas expressas em uma dada célula ou tecido, incluindo todas as isoformas e modificações de proteínas. As ferramentas utilizadas frequentemente para as análises proteômicas são a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e a EM. No entanto, uma vez que a técnica de 2D-PAGE possui algumas desvantagens como baixa resolução para proteínas menos abundantes,

---



incapacidade para detectar proteínas com propriedades extremas (pequena, grande, hidrofóbica e propriedades ácidas ou básicas) e ainda a identificação é difícil, demorada e dispendiosa; a EM vem sendo utilizada e produzindo resultados satisfatórios. Esta tecnologia já foi aplicada para a descoberta de biomarcadores e diagnóstico de neoplasias de ovário, próstata, mama, bexiga, renal, pulmão e pâncreas (ZHANG, X. W. *et al.*, 2007).

A metabonômica vem sendo sugerida como a tecnologia ômica que proporciona a informação mais fidedigna de um sistema biológico, pois embora o transcriptoma represente o mecanismo de entrega do código translacional para a síntese de proteínas nas células, aumentos nos níveis de RNA mensageiros (RNA<sub>m</sub>) nem sempre se correlacionam com aumentos nos níveis de proteínas. Além disso, uma vez traduzida, uma proteína pode estar ou não enzimaticamente ativa. Devido a estes fatores, mudanças no transcriptoma e proteoma não necessariamente correspondem a alterações no fenótipo bioquímico. Outra consideração importante é que RNA<sub>m</sub> e proteínas são identificados através de banco de dados o que pode limitar a informação, dependendo da abrangência de informações do banco de dados utilizado (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Portanto, uma vez que os metabólitos são considerados indicativos da atividade de proteínas e genes envolvidos em uma via biológica a determinação do metaboloma pode realmente prover a informação mais abrangente dentre as tecnologias “ômicas”. Desta forma, podemos dizer que os efeitos de perturbações genéticas podem ser avaliados em múltiplos níveis, os quais incluem o transcriptoma, proteoma e metaboloma. Porém, mudanças no metaboloma ocorrem como consequência das mudanças no transcriptoma as quais promovem mudanças nos níveis ou atividades de enzimas e sendo assim, a análise metabonômica oferece uma abordagem imparcial para identificar e compreender as vias metabólicas que são perturbadas em um estado de doença (RYAN; ROBARDS, 2006; YAP, 2011).

Apesar destas considerações, cabe ainda dizer que está cada vez mais claro que alcançar o tratamento de neoplasias por meio da aplicação apenas de uma tecnologia ômica é mais difícil. No entanto, é difícil estabelecer uma ligação direta entre genes e/ou proteínas e metabólitos. Por exemplo, múltiplos RNA<sub>m</sub> podem ser formados a partir de um gene; assim como múltiplas proteínas a partir de um RNA<sub>m</sub>; ou ainda múltiplos metabólitos podem ser formados a partir de uma enzima; e este

---

mesmo metabólito pode participar em muitos caminhos diferentes (ILYIN; BELKOWSKI; PLATA-SALAMAN, 2004). Isto complica a interpretação e integração dos diversos dados obtidos nestas análises e mostra então o quão difícil é estabelecer e validar um biomarcador para uma determinada patologia.

Por ser a ferramenta central deste trabalho, maiores detalhes sobre a metabonômica serão abordados a seguir.

### 2.6.1 Metabonômica

O estudo dos produtos da expressão gênica e proteica fornecem elucidações a respeito de disfunções celulares. A este estudo são atribuídos dois nomes: “metabonômica” e “metabolômica”. A metabolômica está envolvida com a medida da concentração de todos os metabólitos de células e tecidos, enquanto a metabonômica quantifica os metabólitos responsáveis pelas respostas do sistema multicelular aos estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas. Em outras palavras, a metabonômica objetiva entender as mudanças sistemáticas que ocorrem ao longo de um período em sistemas multicelulares complexos, enquanto a metabolômica tem por alvo uma descrição analítica que inclui a caracterização e quantificação de todas as moléculas de baixo peso molecular presentes na amostra. Na prática, os termos são utilizados como sinônimos e os procedimentos de análise são os mesmos (NICHOLSON; LINDON, 2008; YAP, 2011).

O metaboloma é definido como a coleção de substâncias de baixo peso molecular (metabólitos  $\cong$  1500 Da) presentes em uma célula com as funções de crescimento, manutenção e funcionamento. Geralmente, incluem espécies orgânicas como aminoácidos, carboidratos, vitaminas e lipídios, no entanto, substâncias inorgânicas e espécies elementares também podem ser estudadas (DUNN; ELLIS, 2005). A metabolômica, portanto, compreende a medição de metabólitos endógenos e pode fornecer uma visão geral do estado metabólico de um sistema biológico (LIN; VIANT; TJEERDEMA, 2006).

---

Uma das vantagens de se utilizar a metabonômica frente a proteômica e transcriptômica está na redução da complexidade da amostra, ou seja, o número de metabólitos em uma célula é bem menor que o número de genes e proteínas. A título de curiosidade, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui mais de 6.000 genes e cerca de 600 metabólitos e o metaboloma humano 20 mil genes e 7.800 metabólitos. Outra vantagem é que os metabólitos são os produtos finais da expressão gênica e, portanto, refletem expressivamente o nível funcional celular. Além destas vantagens, os custos das análises são de duas a três vezes menores que na transcriptômica e proteômica (DUNN; ELLIS, 2005; WISHART *et al.*, 2009).

Fiehn (2002) definiu diferentes abordagens para as análises do metaboloma, entre elas, análises de metabólitos alvo, perfil de metabólitos (*metabolic profiling*), metabonômica global e assinaturas metabólicas (*metabolic fingerprinting*). Entretanto, outros autores afirmam que do ponto de vista metodológico existem apenas duas estratégias: perfil de metabólitos e *metabolic fingerprinting* (DETTMER; HAMMOCK, 2004).

As análises de metabólito alvo são qualitativas e quantitativas de um ou poucos metabólitos relacionados com uma reação metabólica. Já as análises de perfil metabólico (*metabolic profiling*), identificam e quantificam um número pré-definido de metabólitos, geralmente relacionados a um caminho metabólico específico. Esta estratégia é subdividida em duas outras, nomeadas de *metabolic fingerprinting* e *metabolic footprinting* (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005). A primeira são análises rápidas que fornecem classificação de amostras, onde não existe identificação nem quantificação metabólica. A segunda, é tecnicamente similar a primeira, porém, focada na medição de todos os metabólitos extracelulares presentes em um meio de cultura (ALLEN *et al.*, 2003; DUNN; ELLIS, 2005; DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007). Tanto a *metabolic fingerprinting* quanto a *metabolic footprinting* podem ser utilizadas para distinguir os diferentes estados fisiopatológicos de uma célula e também os genes mutantes relacionados com áreas do metabolismo (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005).

A metabonômica global, por sua vez, é o estudo que se baseia na detecção, identificação e quantificação de muitos metabólitos na busca de variações que possam ser usadas para discriminar amostras (ISSAQ *et al.*, 2009).

---

Finalmente, a estratégia de *metabolic fingerprinting* está relacionada com a varredura rápida de um grande número de metabólitos intracelulares detectados por uma técnica analítica ou por uma combinação de técnicas, provendo classificação de amostras sem a necessidade de identificação nem quantificação metabólica (DUNN; ELLIS, 2005).

As aplicações da metabonômica começaram a expandir como complementação à genômica e transcriptômica com o objetivo de determinar funções gênicas em micro-organismos, plantas e animais. Atualmente, existem diferentes aplicações incluindo melhoramento de plantas e avaliação da qualidade de culturas, avaliação e segurança alimentar, avaliação de toxicidade, avaliação nutricional, diagnóstico médico e avaliação do estado da doença, desenvolvimento da indústria farmacêutica, melhoria de rendimento nas lavouras e fermentação, descoberta de biomarcadores, avanços tecnológicos em química analítica, genotipagem, adaptações ambientais e elucidação da função de genes (DUNN; ELLIS, 2005; MOCO *et al.*, 2007). No campo do desenvolvimento de novos biomarcadores, a metabonômica apresentou sucesso do diagnóstico precoce em câncer renal (KIND *et al.*, 2007), coloretal (RITCHIE *et al.*, 2010), de pâncreas (URAYAMA *et al.*, 2010), ovário (GUAN *et al.*, 2009), seio (NAM *et al.*, 2009) (CHEN *et al.*, 2009), cervical (WOO *et al.*, 2009), carcinoma hepatocelular (WU *et al.*, 2009) e câncer de bexiga (ISSAQ *et al.*, 2008).

#### 2.6.2. Espectrometria de Massas aliada a quimiometria aplicada a estudos metabonômicos

Historicamente, a maioria dos estudos envolvendo metabólitos foi realizada utilizando-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Estes estudos, em sua maioria, permitiram a detecção de pequenas moléculas, incluindo ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos em biofluidos, provendo informação diagnóstica de diversas desordens metabólicas hereditárias. Hoje em dia a CG-EM ainda vem sendo extensivamente utilizada devido ao seu baixo custo de

análise e grande eficiência de separação de compostos voláteis e semivoláteis (açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, lipídios, peptídios, álcoois de cadeia longa, alcalóides, aminas e amidas), principalmente em metabolismos de plantas. Entretanto existem limitações como, por exemplo, o tipo e tamanho do metabólito que pode ser analisado além da necessidade de uma extensiva preparação de amostra (WANT *et al.*, 2006).

Além da CG-EM, as técnicas analíticas de detecção mais utilizadas nas análises metabonômicas são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM) (GRIFFIN; SHOCKCOR, 2004).

A RMN é bastante utilizada para a caracterização de compostos e tem a vantagem de não utilizar etapas de pré-tratamento das amostras e fornecer análises não destrutivas. Porém esta técnica apresenta algumas desvantagens como baixa sensibilidade e resolução que, somado a uma restrita faixa de concentração das amostras, resulta na detecção apenas de metabólitos de média a alta abundância (WANT *et al.*, 2006). O uso da espectroscopia de RMN já foi demonstrado em análises de amostras de carcinomas humanos, tais como os de tireóide, mama, ovário, próstata e tecidos cerebrais, entre outros (RUSSELL *et al.*, 1994; SOMORJAI *et al.*, 1995; SOMORJAI *et al.*, 1996; HAHN *et al.*, 1997; WALLACE *et al.*, 1997; MOUNTFORD *et al.*, 2001; SOPER *et al.*, 2002; IORIO *et al.*, 2005; ODUNSI *et al.*, 2005).

Em contrapartida a técnica de RMN, estratégias analíticas baseadas em EM são mais sensíveis com a possibilidade de detecção e confirmação da identidade dos compostos desconhecidos presentes em matrizes biológicas complexas (GRIFFIN; SHOCKCOR, 2004). Além disso, a combinação da EM com técnicas de separação como a cromatografia expande a capacidade seletiva de análise, pois permite a separação e a identificação dos metabólitos de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005; WANT *et al.*, 2006; ISSAQ *et al.*, 2009). Em particular a combinação da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (CLAE/ESI-EM), oferece a possibilidade de identificação e quantificação de uma ampla variedade de compostos polares, menos polares e neutros, mesmo em baixas concentrações, bem como possui uma excelente reprodutibilidade e sensibilidade permitindo, portanto, uma eficiente quantificação. A grande vantagem em se utilizar

---

CLAE-EM em análises metabonômicas está na sua habilidade de determinar metabólitos com precisão em poucos minutos a partir de uma pequena quantidade de material e com um simples preparo de amostra (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005; WANT *et al.*, 2006). Portanto, a EM tem um papel fundamental na análise química de metabólitos devido a sua versatilidade, sensibilidade e especificidade (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005).

Estudos metabolômicos que utilizam a EM podem ser realizados de três maneiras diferentes: EM acoplada a cromatografia gasosa (CG-EM), análise de injeção em fluxo e espectrometria de massas sequencial (FIA-EM/EM) e EM acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência e EM sequencial (CLAE-EM/EM). Cada uma destas técnicas podem ser realizadas com equipamentos de diferentes graus de resolução, por exemplo, desde instrumentos quadrupolos até instrumentos de alta resolução como por exemplo o espectrômetro de massas com ionização por ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR-MS) e o Orbitrap (GRIFFITHS *et al.*, 2010).

Alguns estudos metabonômicos associados à quimiometria realizados para a descoberta de biomarcadores para detecção de neoplasias incluem: a técnica por CG-EM de compostos orgânicos voláteis, principalmente alcanos, decanos, heptanos e derivados de benzeno na respiração de pacientes com câncer de pulmão (PHILLIPS *et al.*, 1999; PHILLIPS *et al.*, 2003); a pesquisa metabonômica utilizando CLAE-EM/EM sobre doenças do fígado, com redução do resultado falso-positivo no diagnóstico de câncer a partir das doenças hepatocirrose e hepatite além da detecção de oito potenciais biomarcadores para distinguir o câncer de fígado das doenças hepatocirrose (YANG *et al.*, 2005); a detecção de seis metabólitos específicos para o câncer de próstata utilizando MicroTOF-Q (espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo e tempo de voo) (LOKHOV *et al.*, 2010) e a detecção de um total de 58 metabólitos no soro sanguíneo, e 71 metabólitos no tecido pulmonar de pacientes com câncer de pulmão, utilizando CG-EM (HORI *et al.*, 2011).

Outra técnica que vem sendo aplicada em análises metabonômicas associadas a análises quimiométricas é a infusão direta por espectrometria de massas (DIMS). Nesta técnica, as amostras são injetadas ou infundidas para dentro da fonte de ionização do espectrômetro de massas sem nenhuma separação

---

cromatográfica preliminar, o que resulta em um espectro de massas para cada amostra em poucos segundos, representativo da composição da mesma. Ao se obter o espectro de massas, a lista obtida correlacionando os valores de  $m/z$  e respostas é utilizado para classificação das amostras. Isto significa dizer que esta é uma técnica de triagem e não uma ferramenta quantitativa e, portanto, a identificação dos metabólitos pode ser realizada por meio de instrumentos de alta resolução e precisão (DUNN; ELLIS, 2005; DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007).

As vantagens a serem citadas ao se utilizar DIMS é que nenhuma separação cromatográfica ou etapas de derivatização da amostra são necessárias e, portanto, os metabólitos não são perdidos durante o preparo da amostra. Além disso, o tempo de análise reduzido aumenta a reprodutibilidade entre as amostras (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005) (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007).

Apesar da rapidez e elevado número de amostras serem analisadas por DIMS, algumas limitações são apresentadas por esta técnica. A primeira delas refere-se aos isômeros que não podem ser diferenciados uma vez que apresentam a mesma fórmula molecular, conseqüentemente apresentam as mesmas massas e, portanto podem possuir o mesmo perfil de fragmentação (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005). No entanto, esse problema vem sendo solucionado ao se utilizar equipamentos de alta resolução tais como os que possuem analisadores TOF e os de ionização por FT-ICR-MS. Além disso, esses equipamentos permitem a obtenção da composição elementar dos analitos de baixa massa molecular por meio de medições precisas de massa com erros na faixa de partes por milhão (ppm) (LIN *et al.*, 2010). A segunda limitação a ser colocada é a possibilidade da presença de íons fragmentos na fonte de ionização o que pode aumentar a complexidade dos espectros de massas levando a interpretações errôneas (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005). No entanto, a terceira limitação é a mais preocupante, ou seja, a possibilidade de supressão iônica. Qualquer mecanismo que seja capaz de diminuir a taxa de produção das gotículas de evaporação (como por exemplo a presença de compostos menos voláteis) e, portanto influenciar a quantidade de íons carregados presentes na fase gasosa que atinjam o detector, pode participar na supressão de ionização (ANNESLEY, 2003). Uma vez que ao se utilizar DIMS todos os componentes das amostras são introduzidos simultaneamente na fonte de ionização

---

os efeitos provenientes da matriz são inevitáveis e a supressão do sinal pode ocorrer, resultando em sensibilidade e capacidade de identificação de metabólitos reduzidas (KING *et al.*, 2000). Uma alternativa para a segunda e terceira limitações seria a realização do estudo por meio de outra técnica analítica em comparação à utilização da DIMS, como por exemplo CLAE-EM. Entretanto, poucos estudos têm comparado os dois métodos de análise metabonômica, principalmente utilizando o mesmo espectrômetro de massas (LIN *et al.*, 2010).

As aplicações da técnica de DIMS são principalmente concentradas nas áreas microbiológica e de plantas utilizando *metabolic footprinting* e *fingerprinting* (SMEDSGAARD; FRISVAD, 1996; ALLEN *et al.*, 2003; CASTRILLO *et al.*, 2003). Alguns exemplos a serem citados são a elucidação de importantes diferenças entre óleo de castanha e outros óleos vegetais (GOODACRE *et al.*, 2002); o desenvolvimento de um método baseado na infusão de extratos de esteróis para classificar óleos vegetais de acordo com sua origem botânica (LERMA-GARCIA *et al.*, 2008); estudo dos efeitos metabólicos da simbiose entre o fungo endofítico *Neotyphodium lolii* e seu hospedeiro *Lolium perenne* em três diferentes tecidos (folhas imaturas, lâmina e bainha) (CAO *et al.*, 2008) e a avaliação do conteúdo de polifenóis em extratos de framboesa, amora silvestre e morango (MCDUGALL; MARTINUSSEN; STEWART, 2008). Em aplicações clínicas, DIMS com espectrometria de massas sequencial (DIMS-EM/EM) vem sendo utilizada no diagnóstico de doenças metabólicas hereditárias (CHACE *et al.*, 1998; RASHED, 2001; ZYTKOVICZ *et al.*, 2001). Alguns estudos em que DIMS foi utilizado com sucesso incluem a determinação de seis metabólitos específicos para a detecção do câncer de próstata (LOKHOV *et al.*, 2010), a observação de 23 potenciais biomarcadores para a detecção do câncer de rins (LIN *et al.*, 2010), a detecção de metabólitos no plasma sanguíneo com grande potencial clínico para o diagnóstico de câncer de pulmão humano em estágio inicial (LOKHOV; KHARYBIN; ARCHAKOV, 2012). Os resultados destes estudos demonstram que a maior vantagem em se utilizar a técnica de DIMS está na alta reprodutibilidade dos resultados o que permite, portanto, uma subsequente classificação efetiva dos metabólitos (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007).

---



### 2.6.3 Amostras utilizadas em Metabonômica

Os fluidos corporais levam consigo informações relacionadas ao estado momentâneo de um organismo e podem ajudar no reconhecimento dos balanços fisiológicos. Por este motivo são bastante empregados em análises metabonômicas, sendo os mais utilizados a urina, o líquido cefalorraquidiano (LCR) e o plasma e soro sanguíneos (DEKKER *et al.*, 2007).

Apesar das amostras de urina ser de fácil aquisição e sua análise ser útil para monitorar metabólitos, as variações entre os indivíduos reduzem a sua utilidade para os estudos metabolômicos. No caso do LCR, a aquisição das amostras é altamente invasiva e, portanto, indesejável para os estudos metabolômicos onde várias amostras são necessárias. Por sua vez, o uso de plasma ou soro sanguíneo nos estudos metabolômicos é mais adequado, pois além da coleta ser menos invasiva, as proteínas e/ou fragmentos de proteínas fornecidos pelos tecidos doentes refletem as mudanças sistêmicas (BANKS *et al.*, 2005; WANT *et al.*, 2006).

O plasma é a porção líquida do sangue na qual as células estão suspensas enquanto o soro é o fluido que permanece a partir do plasma após a coagulação das proteínas. A vantagem de utilizar amostras de plasma em estudos ômicos é a preseça de uma quantidade maior de proteínas. A desvantagem está na dificuldade em detectar as proteínas de baixa abundância associadas a uma doença na presença de muitas proteínas comuns envolvidas na coagulação do sangue (ZHANG, X. *et al.*, 2007).

A descoberta e identificação destas proteínas presentes no sangue é uma tarefa difícil, uma vez que 99% das proteínas são comuns no sangue, restando apenas 1% que são excretadas pelas células e, portanto, moduladas em função de respostas fisiológicas, como o surgimento de um tumor. Por este motivo, o estudo de sistemas biológicos requer a utilização de ferramentas de alta sensibilidade como a espectrometria de massas (VEENSTRA *et al.*, 2005).

A preparação das amostras para análises de metabólitos depende do tipo da amostra e estratégia metabonômica empregada. Em muitas aplicações, não há necessidade de se isolar os metabólitos da matriz, porém em alguns casos as amostras de biofluidos necessitam de etapas de pré-tratamento, como por exemplo

---

a precipitação de proteínas com solventes orgânicos, também chamada de depleção das proteínas de alto peso molecular (PAPM) (DUNN; ELLIS, 2005).

As amostras de plasma/soro sanguíneo são caracterizadas por uma dinâmica faixa de concentração de proteínas (variando de  $\text{pg mL}^{-1}$  a  $\text{mg mL}^{-1}$ ), sendo que 65 a 97% são PAPM como a albumina, imunoglobulinas, transferrinas e lipoproteínas (TIRUMALAI *et al.*, 2003). Devido a sua grande quantidade, a presença das PAPM dificulta a detecção das moléculas de baixo peso molecular, e considerando que estas são as moléculas de interesse em estudos metabólicos, o primeiro passo nos protocolos analíticos é a depleção das PAPM (MERRELL *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2004; DEKKER *et al.*, 2007).

Existem diferentes métodos de depleção das PAPM, entre eles a ultrafiltração por centrifugação, extração em fase sólida (EFS) utilizando colunas ou placas de disco e extração com solventes orgânicos, cada método com suas vantagens e desvantagens. A ultrafiltração por centrifugação utiliza a força centrífuga para forçar um líquido contra uma membrana semi-permeável que possui um determinado tamanho de corte (10 a 50 kDa). Os sólidos suspensos e solutos de alto peso molecular permanecem retidos, enquanto os líquidos e solutos de baixo peso molecular atravessam a membrana. As vantagens desta técnica são rapidez, facilidade e baixo custo, porém existe uma grande chance de perder substâncias que estejam ligadas às PAPM (LUQUE-GARCIA; NEUBERT, 2007).

A EFS que utiliza colunas pode realizar separação de analitos por meio de troca iônica, metal quelante, ligantes de afinidade, proteínas bacterianas, anticorpos ou combinação destes. Suas vantagens são alta seletividade e reprodutibilidade, no entanto o alto custo (principalmente as colunas de imunodepleção) e a baixa capacidade de amostragem tornam esta técnica menos utilizada. Os princípios químicos de exclusão da EFS que utiliza placas de discos são os mesmos das colunas. A principal vantagem associada com a EFS utilizando placas de disco é a capacidade aumentada para automação, pois as placas são compostas de 96 poços, o que permite o processamento simultâneo de um elevado número de amostras (LUQUE-GARCIA; NEUBERT, 2007).

A precipitação das PAPM com solventes orgânicos dissocia peptídeos e proteínas menores facilitando a sua extração, principalmente na presença de agentes pareadores de íons, como por exemplo, o ácido trifluoracético (TFA). A

---

técnica é simples e fácil, porém do ponto de vista ambiental, a utilização de solventes orgânicos pode ser prejudicial (LUQUE-GARCIA; NEUBERT, 2007) (DEKKER *et al.*, 2007).

Nos experimentos de metabonômica, o cuidado com o manuseio de amostras é muito importante uma vez que as variáveis pré-analíticas podem marcadamente influenciar os resultados (BANKS *et al.*, 2005; DUNN; ELLIS, 2005). Por exemplo, um estudo realizado com amostragem de sangue demonstrou que as formas de se obterem as amostras influenciam na porcentagem de proteínas presentes nestas amostras, ou seja, a posição em que o sujeito está no momento da coleta (sentado ou deitado) pode induzir uma alteração de 10% na concentração de proteínas totais (BOGUSKI; MCINTOSH, 2003). Outro estudo demonstrou a influência do processamento das amostras no resultados obtidos, demonstrando que os perfis de proteínas podem ser influenciados por fatores como tubo de coagulação, ciclos de congelamento/descongelamento, centrifugação (velocidade, tempo e temperatura), armazenamento (tempo e temperatura), tipos de anticoagulante, entre outros.

#### 2.6.5 Interpretação dos dados metabolômicos

As análises metabonômicas resultam em uma grande quantidade de dados impossíveis de serem processados manualmente e que podem consumir muito tempo para serem interpretados (ISSAQ *et al.*, 2009). Análises estatísticas multivariadas e multidimensionais e programas de reconhecimento de padrões são utilizados para tratar a grande quantidade de dados e interpretar os caminhos metabólicos complexos a partir das medições realizadas. Estes algoritmos reduzem a dimensionalidade dos dados permitindo classificar uma amostra através da identificação de padrões inerentes a um conjunto de amostras (ISSAQ; ABBOTT; VEENSTRA, 2008).

---

Duas abordagens gerais para reconhecimento de padrões estão disponíveis: métodos supervisionados e não supervisionados. Ambas as abordagens podem ser aplicadas ao mesmo conjunto de dados para fins diferentes.

Métodos supervisionados requerem a formação de conjunto de dados em que o resultado é conhecido e utilizado para construir um modelo preditivo. Após a construção do modelo, este pode ser utilizado em um conjunto de testes para classificar amostras desconhecidas e medir a precisão preditiva do modelo. Estes métodos são bastante empregados para detectar diferenças sutis entre amostras similares, a fim de identificar potenciais candidatos a biomarcadores. Exemplos de técnicas supervisionadas de reconhecimento de padrões incluem o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) e modelagem independente de analogias em classe (SIMCA). Outros como correção ortogonal de sinal (OSC) em programação genética e redes neurais também são utilizados (GOWDA *et al.*, 2008).

Métodos não supervisionados estabelecem se existe ou não qualquer agrupamento intrínseco em um grupo de amostras e classificam os espectros sem a necessidade de um conhecimento prévio da classe biológica das espécies (como doentes e controles). Exemplos de métodos não supervisionados incluem métodos de agrupamentos hierárquicos (HCA) e análise de componentes principais (PCA). O HCA visa definir agrupamentos naturais baseados na comparação de distâncias entre pares de amostras: pequenas distâncias entre as amostra implicam na semelhança metabólica entre elas representando propriedades fisiológicas semelhantes, hábitos alimentares ou graus e doenças. Os resultados são dispostos em forma de dendogramas que facilitam a visualização das diferentes categorias com um dado nível de similaridade. O método de PCA caracteriza-se por gerar ortogonais e classificar componentes principais (CPs) que explicam a variância dos dados (CLAUDINO *et al.*, 2007; GOWDA *et al.*, 2008). As CPs são um novo conjunto de valores descritores apresentadas como *scores* (relacionados com os agrupamentos e *outliers*) e *loadings* (relacionados com as variáveis que permitem as previsões de agrupamentos e *outliers*) (YANG *et al.*, 2004; WANT; CRAVATT; SIUZDAK, 2005; LU *et al.*, 2008). Por este motivo, PCA vem sendo muito utilizado em análises de classificação de amostras biológicas tais como análise de soro, plasma e urina para a discriminação entre grupos controles e pacientes com câncer

---

oral, de pulmão e fígado, respectivamente (YANG *et al.*, 2004; TIZIANI; LOPES; GUNTHER, 2009; LOKHOV; KHARYBIN; ARCHAKOV, 2012).

#### 2.6.5.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais (PCA) é um dos métodos mais antigos e mais amplamente utilizados dentre as técnicas multivariadas. O objetivo da PCA é descrever a variância de um conjunto de dados multivariados em termos de um conjunto de variáveis ortogonais subjacentes, denominadas CPs (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

As medidas obtidas podem ser organizadas em uma tabela de dados (Matriz X), onde cada linha constitui uma observação (amostra) e as colunas representam as variáveis ou fatores medidos (por exemplo, comprimento de onda ou relação massa/carga, entre outros). Uma PCA faz com que seja possível fornecer um resumo de todas as observações ou amostras obtidas em uma tabela de dados. Além disso, os agrupamentos, tendências e amostras anômalas também podem ser encontrados. O princípio da análise é a conversão dos dados multivariados presentes na tabela de dados em um modelo plano de projeção que aproxima todas as linhas (observações) da matriz X (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007) (Figura 2). Em outras palavras podemos dizer que na PCA, a dimensão dos dados originais é diminuída para um menor conjunto de dimensões chamadas de Componentes Principais – CPs, cuja principal característica é a ortogonalidade. Como vantagem, o novo conjunto de variáveis (CPs), concentra a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, diminuindo assim a dimensionalidade dos dados, sem perda significativa da informação química (MATOS *et al.*, 2003).

A maioria dos aplicativos disponíveis utiliza a técnica de decomposição do valor singular (SDV) para obter as CPs, sendo neste caso a primeira componente principal (CP1) definida na direção (eixo) de maior variância do conjunto de variáveis originais. De forma decrescente em termos de variação são definidas as demais componentes principais, porém estas serão sempre ortogonais a CP1 e entre si. Um

modelo de PCA aproxima-se da variação de uma tabela de dados por meio de um modelo plano de baixa dimensão (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007).

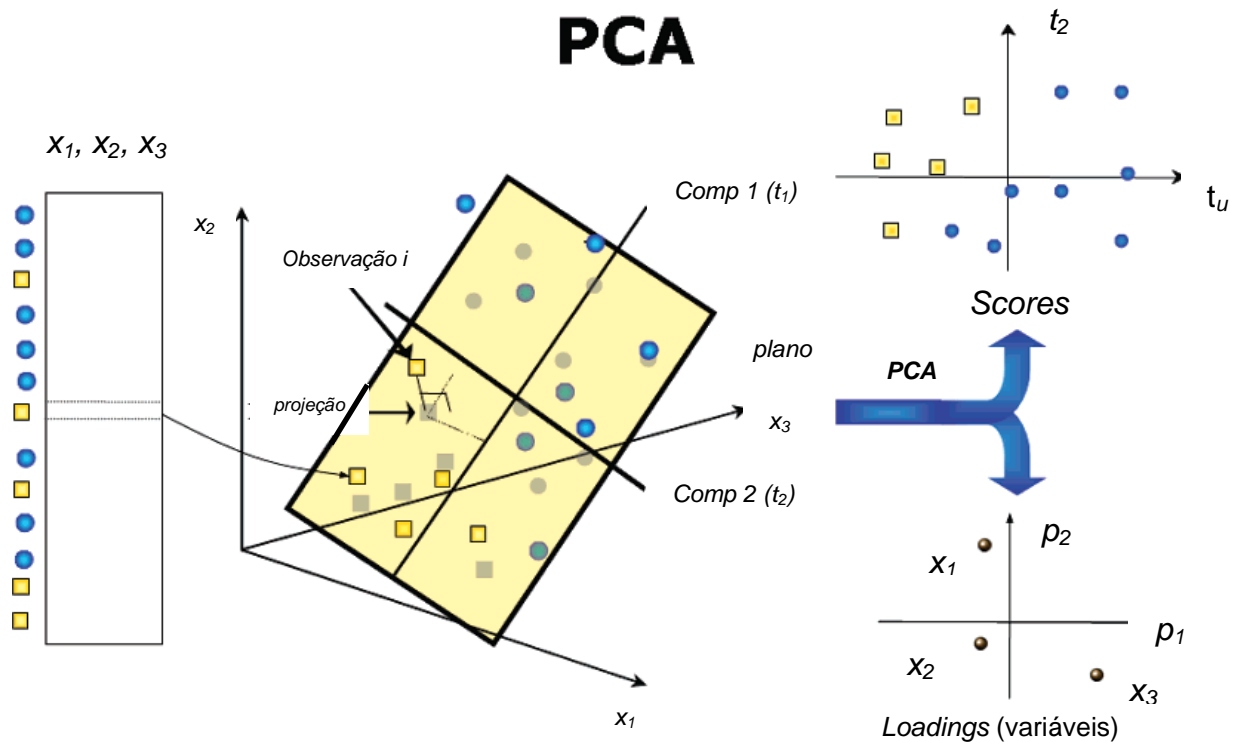


FIGURA 2 – PRINCÍPIO DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A partir das CPs são gerados dois novos conjuntos de dados chamados de *scores* e *loadings*. Estes dois conjuntos trazem informações sobre as amostras e as variáveis, respectivamente (MATOS *et al.*, 2003).

Os *scores* ( $t$ ) representam as pequenas dimensões do plano que aproximam os eixos  $x_1, x_2$  e  $x_3$ . A dispersão dos dois primeiros vectores ( $t_1$ - $t_2$ ) fornece um resumo de todas as observações ou amostras da tabela de dados bem como aponta agrupamentos, tendências e amostras anômalas. A posição de cada objeto no plano é utilizada para relacionar um objeto com outro, assim aqueles que estão próximos uns dos outros têm um perfil multivariado semelhante enquanto aqueles que se distanciam possuem propriedades diferentes (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007).

Análogos aos *scores*, os *loadings* ( $p_1$ ,  $p_2$ ) definem a relação entre as variáveis medidas, ou seja, as colunas da matriz X. Um gráfico de *loadings* mostra a influência de uma amostra para a construção do modelo. Uma consideração importante a fazer é que as direções obtidas para o gráfico de *scores* correspondem às direções no gráfico de *loadings*, sendo possível, portanto, identificar as variáveis (*loadings*) que diferenciam os grupos de objetos (*scores*). Importante também considerar que a parte da matriz X que o modelo não consegue explicar formam os resíduos (*E*) os quais representam a distância entre cada ponto no espaço e sua projeção no plano. Portanto, os *scores*, os *loadings* e os resíduos descrevem toda a variação dos dados presentes na matriz X (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007).

Alguns exemplos de aplicações da PCA no campo da metabonômica são a diferenciação entre pacientes com hepatite e hepatocirrose de pacientes com câncer de fígado (YANG *et al.*, 2004), a diferenciação entre amostras de urina de rato após a administração de três produtos farmacêuticos (PLUMB *et al.*, 2002); estudos de toxicidade obtidos por meio da análise de biofluidos por RMN (HOLMES *et al.*, 1998; HOLMES *et al.*, 2000; WATERS *et al.*, 2001), detecção de câncer de ovário por RMN de  $^1\text{H}$  (ODUNSI *et al.*, 2005), entre outras.

#### 2.6.5.2 Análise por mínimos quadrados parciais (PLS)

A análise por mínimos quadrados parciais (PLS) é um método muito utilizado onde se procura uma relação quantitativa entre duas tabelas de dados X e Y. Esta relação geralmente compreende dados espectrais ou cromatográficos obtidos em um conjunto de amostras de calibração e uma outra matriz Y a qual contém valores quantitativos, como por exemplo a concentração de metabólitos endógenos. A análise de PLS também pode ser utilizada como discriminativa (PLS-DA), ou seja, a matriz Y possui valores qualitativos (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007).

Para que se encontre uma melhor correlação possível entre as matrizes X e Y uma leve rotação das componentes principais é realizada e com isso uma

mudança nos valores de scores é obtida. Por este motivo, o termo componente principal é substituído por variáveis latentes (VL).

O número de variáveis latentes utilizados no processo de calibração é obtido por meio de validação cruzada (*cross validation*), ou seja, a escolha das VL se dá por meio da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração (BARTHUS; MAZO; POPPI, 2005). A validação cruzada pode ser realizada de duas formas: em blocos (*Venetian blinds*) ou ainda por um caso conhecido como “deixe um de fora” (*leave one out*). Na validação utilizando *venetian blinds*, um número determinado de amostras não participa do processo de construção do modelo e a seguir essas amostras são previstas pelo modelo construído. No caso de utilizar a validação *leave one out*, uma amostra é deixada de fora no processo de construção do modelo e a seguir essa amostra é prevista pelo modelo construído. Em ambos os casos, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas. Por fim, a raiz quadrada da soma dos erros médios da validação cruzada (RMSECV – do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*) é calculada (BRERETON, 2000).

Outro fator importante nas análises de PLS é a detecção de amostras anômalas. A presença desse tipo de amostra no conjunto de calibração pode fornecer modelos com baixa capacidade de previsão, ou seja, que produzem altos valores de erro. Assim, a identificação de anomalias otimiza a obtenção dos conjuntos de calibração sendo que, a exclusão destas permite a construção de modelos mais eficientes e precisos e com melhor capacidade de previsão (JOUAN-RIMBAUD *et al.*, 1999).

Existem diversas técnicas para a identificação de amostras anômalas, como por exemplo: a distância de Mahalanobis (BEDRICK; LAPIDUS; POWELL, 2000; DE MAESSCHALCK; JOUAN-RIMBAUD; MASSART, 2000), método da incerteza, funções potenciais, RHM (do inglês, *Resampling by the Half-Means*), SHV (do inglês, *Smallest Half- Volume*), entre outros (JOUAN-RIMBAUD *et al.*, 1999; PIERNA *et al.*, 2002). No entanto, foram utilizadas no presente trabalho duas grandezas complementares: resíduos de Student e *leverage*. Os resíduos de Students correspondem aos desvios obtidos entre os dados de referência e os estimados pelo modelo. Desta forma, pode-se dizer que valores altos de resíduos significa que o modelo não está sendo capaz de modelar os dados adequadamente. Supondo que os resíduos são normalmente distribuídos pode-se aplicar o teste t para verificar se a

---



amostra está ou não dentro da distribuição com um nível de confiança de 95%. Como os resíduos de Student são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio, os valores além de  $\pm 2,5$  são considerados altos. Já os valores de *leverage* são uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Assim, podemos dizer que uma amostra tem pouca influência na construção do modelo se ela possuir valores baixos de *leverage* (o que indica que a amostra encontra-se próxima do centro dos dados). Do contrário, um alto valor de *leverage* significa dizer que a amostra está distante da média e possui, dessa forma, grande influência para o desenvolvimento do modelo. Portanto, podemos dizer que os valores de *leverage* indicam se uma amostra é diferente ou não das demais. No entanto, é necessária uma avaliação conjunta com resíduos de Students para afirmar se uma amostra corresponde realmente a uma anomalia. Os valores de *leverage* são obtidos por meio da fórmula  $3 \times VL / n$ , onde  $n$  é o número de amostras utilizadas no conjunto de calibração (BARTHUS; MAZO; POPPI, 2005).

Depois de estabelecido o número de VL e detectadas as amostras anômalas, o modelo pode ser estabelecido e destinado à previsão de novas amostras.

Alguns exemplos da aplicação de PLS-DA são a descoberta de biomarcadores urinários para a fosfolipidose (acúmulo excessivo de fosfolipídios nos tecidos) (DIETERLE *et al.*, 2006), descoberta de nove tipos de biomarcadores para fístula intestinal utilizando cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a espectrometria de massas (UPLC/Q-TOF MS) (YIN *et al.*, 2008), detecção e diagnóstico de desordens hereditárias do metabolismo em amostras de urina por meio de RNM (CONSTANTINO *et al.*, 2005) e investigação de biomarcadores para a deterioração da função hepática aguda em hepatite B crônica utilizando CLAE-EM (YANG *et al.*, 2006), entre muitas outras.

---

### 2.6.5.3 Pré-processamento de dados

Antes de aplicar análises quimiométricas a dados matemáticos, na maioria das vezes, dependendo da natureza dos dados, é necessário realizar um pré-processamento nos dados originais. Existem muitos tipos de pré-processamentos, porém os principais e amplamente utilizados são dados centrados na média e autoescalamento. O pré-processamento de dados centrados na média, corresponde a modelagem da variação em torno da média. Primeiramente calcula-se a média de cada variável e em seguida subtrai-se os dados originais da média calculada. O autoescalamento é um pré-processamento recomendado quando a variável preditora é de uma natureza diferente e não é medida na mesma escala. Calculam-se as variâncias de todas as variáveis. Padronizar todas as variáveis na mesma variância pode ser visto como uma maneira de todas as variações ao acaso influenciarem por igual o modelo. A Figura 3 demonstra um exemplo destes tipos de pré-processamento. Na Figura 3a podem ser observadas 10 variáveis (representadas por retângulos) e é visível que elas possuem tamanhos muito diferentes. Ao se aplicar o pré-processamento dados centrados na média colocamos todas as médias em zero (ver Figura 3b). Já na Figura 3c temos os dados autoescalados e o tamanho das variáveis é basicamente o mesmo (MATOS *et al.*, 2003).

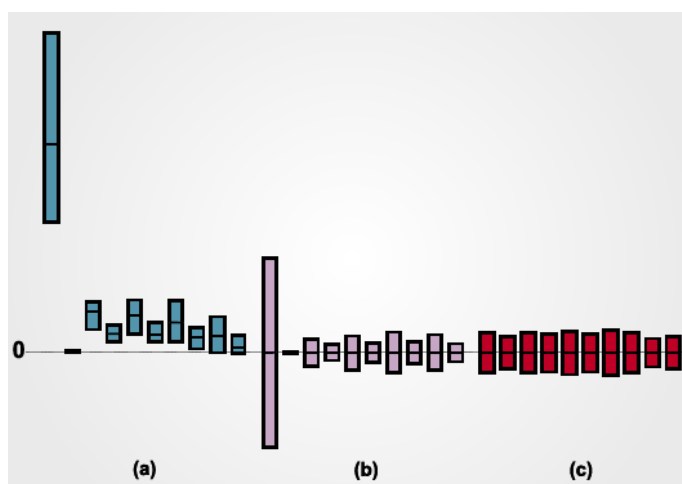


FIGURA 3 – TIPOS DE PRÉ-PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS UTILIZADOS EM ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS. (A) DADOS ORIGINAIS, (B) DADOS CENTRADOS NA MÉDIA E (C) AUTOESCALAMENTO. FONTE: (MATOS *et al.*, 2003)

---

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

---

---

### 3.1 REAGENTES

Acetonitrila (grau CLAE) e ácido fórmico (88,0%) foram adquiridos da J. T. Baker Chemicals B. V. (Deventer, Holanda). Éter etílico (99,0%), ácido trifluoroacético (99,0%), ácido tricloroacético (99,0%), penicilina G, sulfato de estreptomicina, dimetilsulfóxido e solução de azul de tripan (0,4%, *p/v*) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). O meio de cultura RPMI 1640 foi adquirido da Hy-media (Tokio, Japão) e o soro feal bovino da Cultilab (Campinas, Brazil). A água ultrapura foi obtida utilizando um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA).

### 3.2 ANIMAIS

No presente trabalho foram utilizados camundongos adultos sadios (machos e fêmeas) de linhagem heterogênea (Swiss) e de linhagem isogênica (Balb-C) de 7 a 10 semanas de idade e massa corporal de aproximadamente 22 a 30 gramas. Os camundongos Swiss foram gentilmente fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da Universidade Federal do Paraná, enquanto os camundongos isogênicos Balb-C, foram adquiridos do biotério da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).

Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (22-24 °C), umidade (45-65%) e luz (12 h luz/12 h escuro) e receberam água e comida *ad libitum*. Os protocolos experimentais envolvendo os animais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Setor da Saúde da Universidade Federal do Paraná sob registro AN.019.002.09.05.

---

### 3.3 CULTIVO DE CÉLULAS TUMORAIS

As células dos tumores ascítico de Ehrlich e Sarcoma 180 foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra Maria Regina Orofino Kreuger da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Elas foram mantidas em freezer a -80 °C (Revco Legaci Ultima Plus modelo ULT 2586-10-A42), em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10% (v/v), 0,3 g/mL de penicilina G, 50 U.I/mL de sulfato de estreptomicina e dimetilsulfóxido a 10% (v/v).

Para a manutenção *in vivo* das células, estas foram rapidamente descongeladas e cultivadas em meio RPMI 1640 por pelo menos 2 passagens ( $10^5$  células/mL), sendo sua viabilidade (> 90%) avaliada por meio do teste de exclusão com solução de azul de tripan (0,4%, p/v). Os tumores foram mantidos em camundongos Swiss na forma ascítica através do transplante intraperitoneal (i.p.) de  $10^6$  células tumorais a cada 7 dias.

Para a condução dos experimentos, um animal foi eutanaziado por deslocamento cervical e por meio da abertura do abdômen do animal o líquido ascítico foi removido e cuidadosamente coletado com auxílio de uma seringa estéril. Em seguida, 10 µL das células tumorais são misturados a 890 µL de solução de cloreto de sódio 90% (p/v) e 100 µL de solução de azul de tripan 0,4% (p/v). Uma alíquota de 10 µL desta solução é colocada em câmara de Neubauer (Boeco Germany) para a contagem do número de células viáveis por mL de líquido peritoneal em microscópio óptico (Polskie Zaklady Optyczne modelo Studar Lab). Novamente, uma viabilidade maior que 90% foi encontrada. A concentração final da suspensão de células tumorais foi ajustada com solução salina 0,9% (p/v) para  $2 \times 10^6$  células viáveis/mL (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992).

---

### 3.4 INDUÇÃO DOS TUMORES NOS CAMUNDONGOS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Nos experimentos para o diagnóstico das neoplasias utilizadas, os animais foram divididos da seguinte forma:

- Experimentos para diagnóstico de Tumor de Ehrlich em camundongos Balb-C:
    - grupo controle (sem tumor): camundongos Balb-C os quais receberam injeções de solução salina 0,9% (*p/v*);
    - grupo experimental: camundongos Balb-C inoculados com 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão contendo  $2 \times 10^6$  células viáveis de tumor de Ehrlich /mL da suspensão e;
    - grupo sobrevida: camundongos Balb-C os quais receberam a mesma quantidade de células tumorais que o grupo experimental, porém este grupo de camundongos desenvolveu a doença até que ocorresse a morte natural dos mesmos, como consequência da presença da doença.
  - Experimentos para diagnóstico de Tumor de Ehrlich em camundongos Swiss:
    - grupo controle (sem tumor): camundongos Swiss os quais receberam injeções de solução salina 0,9% (*p/v*);
    - grupo experimental: camundongos Swiss inoculados com 500  $\mu\text{L}$  de uma suspensão contendo  $2 \times 10^6$  células viáveis de tumor de Ehrlich /mL da suspensão e;
    - grupo sobrevida: camundongos Swiss os quais receberam a mesma quantidade de células tumorais que o grupo experimental, porém este grupo de camundongos desenvolveu a doença até que ocorresse a morte natural dos mesmos, como consequência da presença da doença.
-

- Experimentos para diagnóstico do Sarcoma 180 em camundongos Swiss:
  - grupo controle (sem tumor): camundongos Swiss os quais receberam injeções de solução salina 0,9% (p/v);
  - grupo experimental: camundongos Swiss inoculados com 500 µL de uma suspensão contendo  $2 \times 10^6$  células viáveis de sarcoma 180 /mL da suspensão e;
  - grupo sobrevida: camundongos Swiss os quais receberam a mesma quantidade de células tumorais que o grupo experimental, porém este grupo de camundongos desenvolveu a doença até que ocorresse a morte natural dos mesmos, como consequência da presença da doença.

O objetivo dos animais sobrevida foi o de verificar quanto tempo os camundongos sobrevivem após a inoculação dos tumores, a fim de determinar se a análise do soro sanguíneo por espectrometria de massas aliada à quimiometria seria eficiente em diagnosticar a doença o mais cedo possível.

Após a indução dos tumores nos animais, as amostras de soro sanguíneo foram obtidas através de punção cardíaca nos períodos após 3, 5, 7 e 10 dias da indução dos tumores (n = 21, cada período). Este procedimento foi realizado estando os animais em jejum de 12 h. O grupo Balb-C inoculado com tumor de Ehrlich também foi testado após 1 e 2 dias da inoculação das células tumorais. Previamente ao procedimento de punção cardíaca, os animais foram anestesiados por meio da inalação de éter etílico. Aproximadamente 0,5 a 1,0 mL de sangue foi coletado de cada animal, os quais, em seguida, foram sacrificados por meio de deslocamento cervical. As amostras de sangue foram centrifugadas (Eppendorf modelo 5810R) durante 6 minutos a 12000 rpm em temperatura ambiente e o soro foi transferido para tubos plásticos de 2 mL (tipo Eppendorf). As amostras de soro foram armazenadas em freezer a – 80 °C até o momento das análises.

---

### 3.5. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS DE SORO

Para avaliar o melhor sistema de depleção das proteínas de alto peso molecular três solventes foram testados: acetonitrila; solução de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) e solução de ácido tricloroacético (TCA) a 60% (v/v).

Para a condução do estudo, amostras de soro foram descongeladas em temperatura ambiente e uma alíquota de 50 µL foi transferida para um frasco de 2 mL. Uma alíquota de 100 µL de cada solvente foi adicionada individualmente ao frasco, e em seguida as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho de gelo durante 5 minutos. Após o resfriamento, as amostras foram agitadas durante 1 minuto (Vortex-Genie 2T modelo SI T236) e então centrifugadas a 14000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo frasco e evaporado a 40 °C em um concentrador de amostras (Labconco CentriVap). Antes das injeções no Espectrômetro de Massas as amostras foram ressuspensas com 150 µL de uma solução de acetonitrila/água/ácido fórmico (70:30:0,1; v/v/v).

### 3.6 QUANTIDADE DE SORO UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES DE DIMS

Foram realizados experimentos para verificar a quantidade de soro a ser utilizada nos experimentos. Para isso, alíquotas de 200, 100 e 50 µL de soro descongelado foram transferidas para um frasco e a precipitação das proteínas de alto peso molecular foi realizada adicionando-se 400, 200 e 100 µL da mistura de acetonitrila/TFA 0,1% (v/v), respectivamente. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho de gelo durante 5 minutos, seguido de agitação durante 1 minuto (Vortex-Genie 2T modelo SI T236) e centrifugação a 14000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo frasco e evaporado a 40 °C em um concentrador de amostras (Labconco CentriVap). Também foram realizados testes para verificar a melhor proporção de diluente para ressuspender as



amostras. Para isso, foram preparadas e testadas misturas contendo acetonitrila, água e ácido fórmico em diferentes proporções para ressuspender as amostras previamente à análise por infusão direta por espectrometria de massas (DIMS).

Dentre elas:

- acetonitrila/ água (50:50) (v/v) com 1 % (v/v) ácido fórmico;
- acetonitrila/ água (50:50) (v/v) com 0,5 % (v/v) ácido fórmico;
- acetonitrila/ água (70:30) (v/v) com 1 % (v/v) ácido fórmico;
- acetonitrila/ água (70:30) (v/v) com 0,5 % (v/v) ácido fórmico;
- acetonitrila/ água (70:30) (v/v) com 0,1 % (v/v) ácido fórmico e

### 3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após testadas as quantidades de soro e composição da solução de ressuspensão das amostras, a metodologia de preparo das amostras ficou estabelecida conforme descrito a seguir.

As amostras de soro foram descongeladas em temperatura ambiente e uma alíquota de 50 µL foi transferida para um frasco de 2 mL. Uma alíquota de 100 µL de acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) foi adicionada ao tubo, e em seguida as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho de gelo durante 5 minutos. Após o resfriamento, as amostras foram agitadas durante 1 minuto (Vortex-Genie 2T modelo SI T236) e então centrifugadas a 14000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo frasco e evaporado a 40 °C em um concentrador de amostras (Labconco CentriVap). Para as análises de DIMS as amostras foram ressuspensas com 150 µL de uma solução acetonitrila/água/ácido fórmico (70:30:0,1; v/v/v) (CHERTOV *et al.*, 2005).

---

### 3.8 ANÁLISES POR INFUSÃO DIRETA NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Os experimentos de infusão direta (DIMS) foram conduzidos em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems modelo API 3200) equipado com uma bomba seringa (Harvard Apparatus, modelo Harvard 22 Dual) e uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). A fonte foi operada no modo positivo, mantendo a posição do capilar em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal. A bomba seringa operou em velocidade de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Os parâmetros ajustados manualmente no equipamento para estabilização do sinal foram voltagem do capilar (IS): 5500 V, potencial de entrada no cone EP: 10 eV, potencial de desagrupamento (DP): 40 eV, gás de Interface (CUR): 10 psi e gás de nebulização (GS1): 15 psi. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR e GS1 foi produzido por um gerador de nitrogênio (Peak Scientific Instruments). Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 50 a 1800 Daltons (Da) acumulando 100 ciclos de 3 segundos (5 minutos). A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Analyst 1.4 (ABI/Sciex).

Os espectros de massas da mistura de acetonitrila/água contendo 0,1% de ácido fórmico utilizada para ressuspender as amostras também foram adquiridos (branco) em cada dia de análise e cada lote da mistura preparada. O objetivo deste procedimento foi subtrair os espectros de massas das amostras do espectro de massas do branco, previamente às análises quimiométricas.

### 3.9 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Os espectros de massas obtidos com os grupos experimental e controle foram subtraídos daqueles obtidos com injeções de um branco (solução de acetonitrila/água/ácido fórmico, 70:30:0.1 v/v/v). Análises de componentes principais (PCA) e dos mínimos quadrados parciais (PLS) foram realizadas utilizando PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvetor Research) operado no software Matlab 7.0.1<sup>®</sup> (Mathworks).

Para as análises de PCA os dados correlacionando massa/carga ( $m/z$ ) e intensidade de sinal (%) foram organizados no software Origin Pro 8 (OriginLab) para comporem a matriz X. Em seguida estes dados foram exportados para o software Matlab, as matrizes foram transpostas e o pré-processamento utilizado para a análise do conjunto de dados foi centragem na média. O número de componentes principais para comporem a análise foi escolhido em função do gráfico que correlaciona autovalores (*Eigenvalues*) versus número de CPs. Escolhidas as CPs foram então plotados os gráficos de *scores* com o objetivo de distinguir grupos experimental e controle e os gráficos de *loadings* para verificar os sinais responsáveis pela distinção.

A calibração por mínimos quadrados parciais (PLS) também foram realizadas para modelar os dados e obter a predição de amostras desconhecidas. Para isso, foram construídos conjuntos de calibração (matriz X e vetor y) para comporem modelos de predição do estágio de desenvolvimento da doença (em dias) para cada linhagem de camundongo (Balb-C e Swiss) inoculada com TE e S180. Nos modelos construídos, a matriz X dos conjuntos de calibração foi obtida colocando em cada coluna uma amostra referente a um camundongo e em cada linha os valores de intensidade máxima obtidos em cada  $m/z$  detectado pelo espectrômetro de massas. O vetor y foi caracterizado pelos valores referentes aos dias de coleta das amostras, ou seja, 0 (controle), 3, 5, 7 e 10 dias. Ao carregar as matrizes X no Matlab, as mesmas foram transpostas. O pré-processamento utilizado para a matriz X e o vetor y foi o autoescalamento, com regressão por quadrados mínimos parciais não interativos (NIPLS) e validação cruzada *Venetian blinds*.

Os conjuntos de calibração foram analisados em função do número de variáveis latentes (VL) que explicassem grande parte da variância dos dados e também em relação aos menores erros encontrados na raiz quadrada média do erro da validação cruzada (RMSECV). A presença de amostras anômalas foi verificada por meio dos gráficos de *leverage versus* resíduos de Students. Além disso, o gráfico de valores medido versus valores preditos também foi avaliado por meio do valor da raiz quadrada do erro médio de calibração (RMSEC) para verificar se o modelo estava apto a predizer as próprias amostras. Por fim, para verificar a eficiências do modelo em predizer amostras desconhecidas, um conjunto de validação foi construído, contendo amostras que não participaram do conjunto de validação e o modelo foi testado por meio da avaliação da raiz quadrada dos erros

médios de previsão (RMSEP). Para cálculo destes valores são usadas as equações 1 e 2 mostradas na Figura 4, em que  $y_i^*$  e  $y_i$  são respectivamente os valores preditos e originais de cada amostra, e “nc” o número total de amostras utilizadas no conjunto de calibração e “np” o número de amostras utilizadas no conjunto de validação.

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i^* - y_i)^2 / nc} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i^* - y_i)^2 / np} \quad (\text{Equação 2})$$

FIGURA 4 – EQUAÇÕES UTILIZADAS PARA CÁLCULO DA RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DE CALIBRAÇÃO (RMSEC) E RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DE PREVISÃO. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DE CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E PREVISÃO, RESPECTIVAMENTE

### 3.10 IDENTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

Experimentos de CLAE-EM/EM foram realizados para auxiliar na identificação dos compostos de maior relevância para a diferenciação entre os grupos controle e experimental destacados na análise quimiométrica. Nesse sentido, as amostras foram preparadas da mesma maneira como descrito no item 3.7, porém as amostras foram ressuspensas em 50 µL da mistura acetonitrila/água/ácido fórmico na proporção de 70:30:0,1 (v/v/v).

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent modelo 1200 (Wilmington, USA) o qual consiste de uma bomba binária (G1311A), um degaseificador (G1379B) um forno (G1316A) e um gerenciador de amostras CTC (Modelo 2777, Waters, Milford, EUA). Este cromatógrafo foi acoplado ao Espectrômetro de Massas do tipo triplo quadrupolo com fonte de *electrospray*, descrito no item 3.8. As separações foram realizadas utilizando uma coluna cromatográfica Poroshell 300SB-C18 (Agilent Technologies Inc., California, USA) de

tamanho 2,1 x 75 mm (5 µm de tamanho de partícula) acoplada a uma pré-coluna Poroshell 300SB-C18 de tamanho 2,1 x 12,5 mm (5 µm de tamanho de partícula) e mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída de acetonitrila (A) e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (B), filtrada através de uma membrana de PTFE de 0,45 µm (Millipore, Molsheim, France) e eluída da seguinte forma:  $t_{0-5\text{min}}$  = isocrático com 35% de A;  $t_{5,1-7\text{min}}$ : gradiente de 35% a 40% de A;  $t_{7,1-9\text{min}}$ : isocrático com 40% de A;  $t_{9,1-11\text{min}}$ : gradiente de 40% a 45% de A e  $t_{11,1-60\text{min}}$ : gradiente de 45% a 90% de A. O fluxo foi mantido a 200 µL/min e o volume de injeção foi de 10 µL.

Os parâmetros ajustados no espectrômetro de massas para as análises de CLAE-EM foram: voltagem do capilar (IS): 5500 V, potencial de entrada no cone EP: 10 eV, potencial de desagrupamento (DP): 40 eV, gás de Interface (CUR): 10 psi, gás de nebulização (GS1): 40 psi e gás auxiliar (GS2): 40 psi. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR, GS1 e GS2 foi produzido por um gerador de nitrogênio (Peak Scientific Instruments). Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 50 a 1800 Daltons (Da). A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Analyst 1.4 (ABI/Sciex).

Para os experimentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM), a cela de colisão foi acionada para a realização dos experimentos de íons produtos utilizando energia de colisão (CE) variando de 20 até 40 eV e potencial de saída da cela de colisão (CXP) variando de 2,0 até 3,8 eV; dependendo do íon selecionado.

---

---

## ***4. RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

No presente trabalho, camundongos da linhagem isogênica Balb-C foram inoculados i.p. com suspensões de células tumorais de Ehrlich. Com o objetivo de obter um diagnóstico precoce do câncer, modificações no perfil metabólico destes animais em diferentes estágios do desenvolvimento da doença foram avaliadas por meio da técnica de infusão direta no espectrômetro de massas associada a análises quimiométricas (DIMS-PCA). Em seguida, o método foi utilizado para verificar a reprodutibilidade dos resultados frente a uma variabilidade genética, ou seja o tumor de Ehrlich foi inoculado i.p. em camundongos da linhagem Swiss. Por último, os resultados foram verificados quando outro tumor, o Sarcoma 180 foi inoculado i.p em camundongos da linhagem Swiss.

A escolha destes animais para a condução dos estudos foi em função das similaridades genéticas, fisiológicas e bioquímicas existentes entre estes roedores e humanos (MARONPOT; FLAKEM; HUFF, 2004). Portanto, os modelos escolhidos poderão contribuir substancialmente para os estudos de elucidação da carcinogênese e detecção de câncer com extrapolação destas informações para humanos (HOOD *et al.*, 2005).

Em relação aos tipos tumores escolhidos, ambos Ehrlich e Sarcoma 180 crescem rapidamente e progressivamente em quase todas as linhagens de camundongos e assim estudos de curta duração podem ser obtidos. Além disso, as células são homogêneas e facilmente transplantáveis, permitindo modelos reprodutíveis (NASCIMENTO *et al.*, 2006; OZASLAN *et al.*, 2011). Por estas razões, estes tipos de tumores foram a primeira escolha para avaliar a possibilidade da detecção precoce do câncer utilizando DIMS-PCA.

#### 4.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS

##### 4.1.1 Quantidade de soro utilizado para as análises de DIMS

Os experimentos utilizando diferentes quantidades de soro sanguíneo foram realizados devido ao fato de que a quantidade de sangue coletada dos animais nem

---

sempre eram satisfatórias para a obtenção de soro para as análises de DIMS. Sendo assim, foram testadas diferentes quantidades de soro sanguíneo para avaliar se isto iria interferir nos resultados obtidos em relação a intensidade do sinal em abundância relativa (%) e também em relação a quantidade de íons detectados na faixa analisada (50-1800 Da).

Foram testadas as quantidades partindo-se de 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L e 50  $\mu$ L de soro sanguíneo. As alíquotas foram tratadas conforme descrito no item 3.6 e os espectros de massas foram adquiridos e avaliados. Os espectros de massas adquiridos estão demonstrados na Figura 5. É possível observar que as amostras que partiram tanto de 200  $\mu$ L quanto de 100  $\mu$ L de soro, precipitadas com acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de TFA e ressuspendidas em acetonitrila/água/ácido fórmico (70:30:0,1) (v/v/v), forneceram um bom resultado quando analisados os parâmetros de intensidade de sinal e quantidade de íons presentes na região analisada. Porém, utilizando 50  $\mu$ L de soro (Figura 5C) é possível observar a maioria dos sinais que estão presentes nas amostras que partiram de 200  $\mu$ L e 100  $\mu$ L de soro (Figuras 5A e 5B) sem perda da intensidade de sinal. Portanto, a utilização de 50  $\mu$ L foi considerada um resultado satisfatório, pois apesar da quantidade inicial de soro ser menor, isso não influenciou a quantidade de sinais detectados e ainda as suas intensidades permaneceram elevadas.

Outra observação importante, é que quando analisadas quantidades maiores de soro sanguíneo o equipamento demonstrava uma perda de sensibilidade em função do acúmulo de soro na peça localizada na câmara de ionização (*curtain plate*) bem como no eletrodo (capilar), necessitando, portanto de limpezas constantes nestas peças. Uma vez que a quantidade menor de soro foi eficiente para obtenção de grande quantidade de íons sem perda de intensidade de sinal e ainda levando em conta a manutenção do equipamento, foi definido que os experimentos seriam realizados partindo-se de 50  $\mu$ L de soro sanguíneo.

---



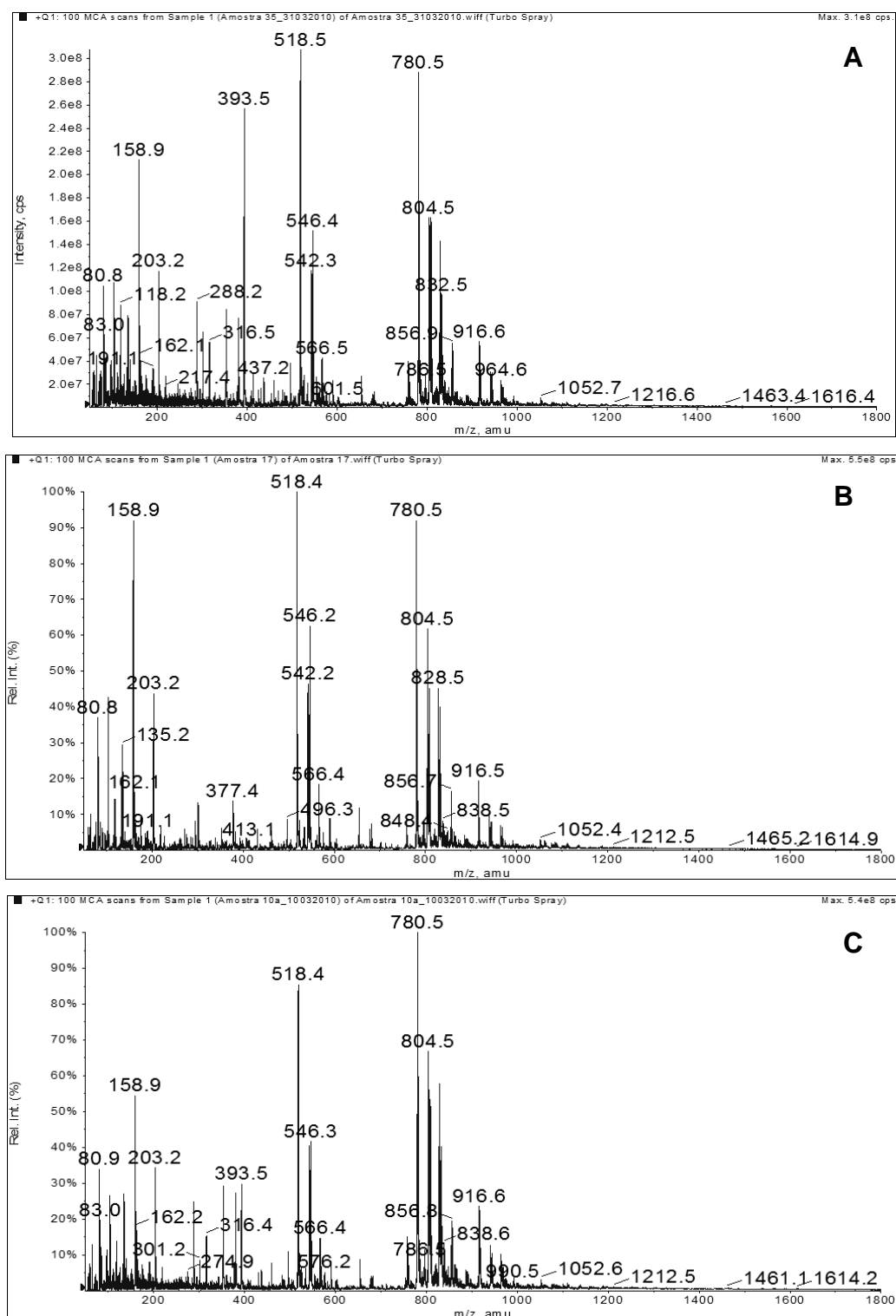


FIGURA 5 – ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS POR DIMS A PARTIR DE DIFERENTES QUANTIDADES DE SORO SANGUÍNEO DE CAMUNDONGO SWISS: (A) 200 µL, (B) 100 µL E (C) 50 µL

Além da avaliação da quantidade de soro sanguíneo a ser utilizada nos experimentos, também foram realizados testes para escolher a melhor solução para

ressuspender as amostras antes da infusão no espectrômetro de massas. Os espectros de massas obtidos com as diferentes proporções de acetonitrila/água/ácido fórmico testadas para ressuspender as amostras (item 3.6), estão apresentados nas Figuras 6 A-B e 7 A-C. Comparativamente, observando as Figuras 6A e 6B é possível perceber que as regiões dos espectros de massas compreendidas entre 300-500 Da e 600-900 Da ficaram um pouco prejudicadas em relação aos parâmetros analisados.

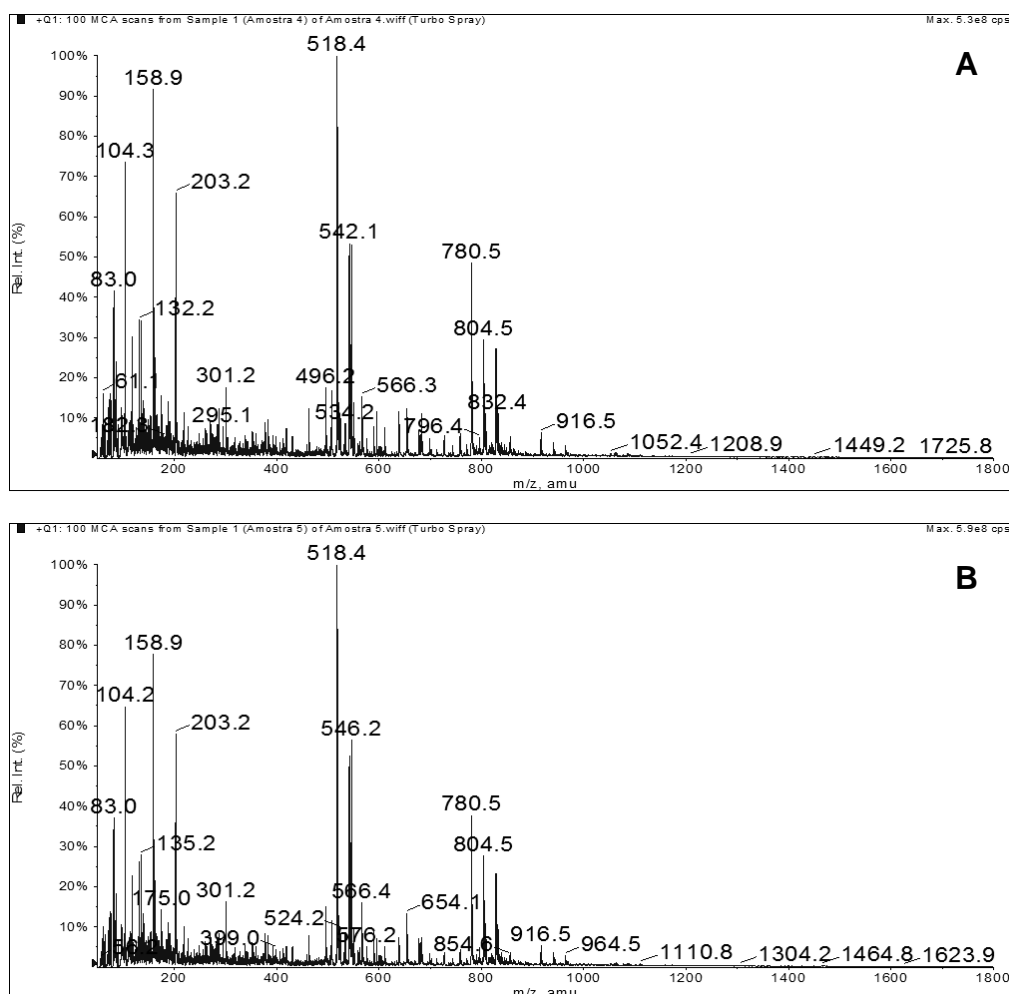


FIGURA 6 – ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS POR DIMS DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS 5 DIAS DA INOCULAÇÃO DO TE. AMOSTRAS PRECIPITADAS COM ACETONITRILA CONTENDO 0,1% TFA (v/v) E RESSUSPENSAS EM: (A) ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (50:50:1; v/v/v) E (B) ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (50:50:0,5; v/v/v)

Quando a proporção de acetonitrila e água foi alterada para 70:30 (v/v), observou-se uma melhora na intensidade de sinal dos íons compreendidos na região entre 300-500 Da quando utilizado 1% de ácido fórmico (Figura 7A), porém uma melhora tanto de intensidade de sinal quanto de íons presentes na região analisada foi observada quando utilizado ácido fórmico na proporção de 0,5% (Figura 7B).

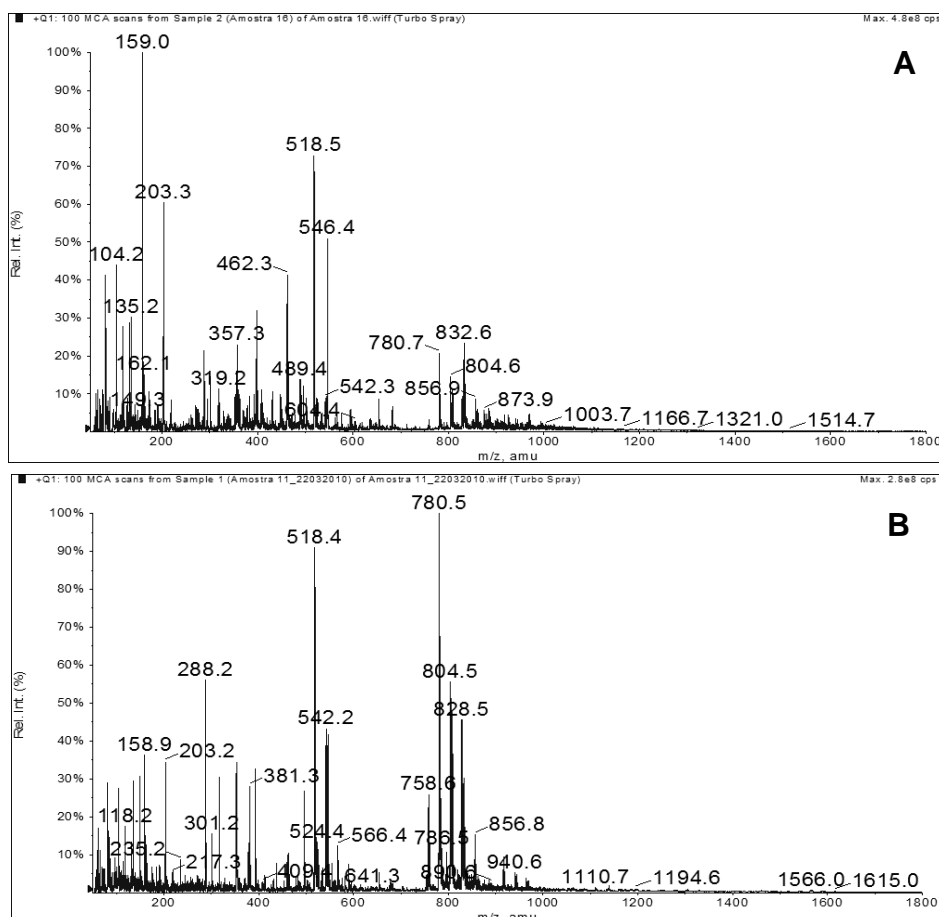


FIGURA 7 – ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS POR DIMS DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGO SWISS APÓS 5 DIAS DA INOCULAÇÃO DO TE EHRlich. AMOSTRAS PRECIPITADAS COM ACETONITRILA CONTENDO 0,1% TFA (v/v) E RESSUSPENSAS EM: (A) ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (70:30:1; v/v/v) E (B) ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (70:30:0,5; v/v/v)

No entanto, após a constatação de um erro experimental na preparação desta última mistura ficando a mesma com uma proporção de 0,1% de ácido fórmico e seguido de infusão das amostras no espectrômetro de massas, também foi possível observar bons resultados em relação à intensidade de sinal e quantidade de íons presentes na região analisada (Figura 8).

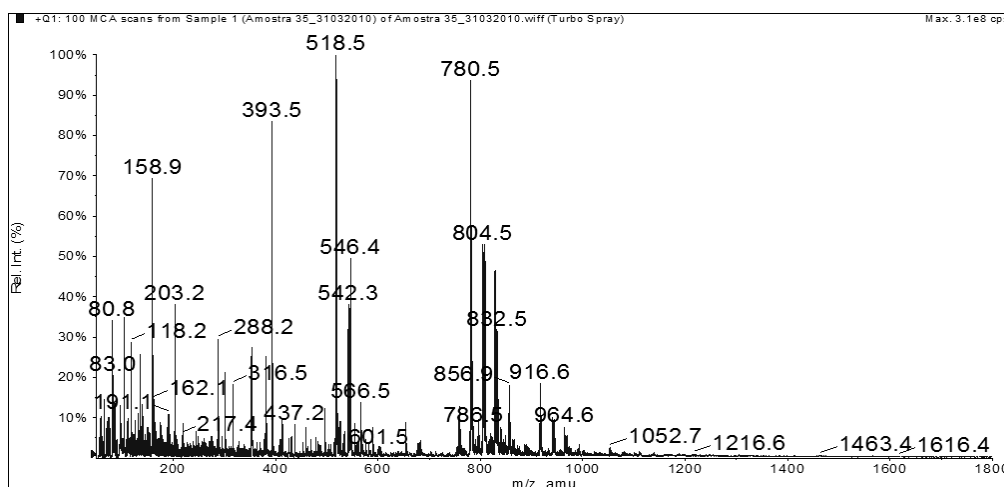


FIGURA 8 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR DIMS DE AMOSTRA DE SORO DE CAMUNDONGO SWISS APÓS 5 DIAS DA INOCULAÇÃO DO TE EHRlich. AMOSTRA PRECIPITADA COM ACETONITRILA CONTENDO 0,1% TFA (v/v) E RESSUSPENSÃO EM ACETONITRILA/ÁGUA/ ÁCIDO FÓRMICO (70:30:0,1; v/v/v)

Sendo assim, o diluente para ressuspensão de todas as amostras ficou estabelecido como uma mistura de acetonitrila/água/ ácido fórmico (70:30:0,1) (v/v/v) e esta mistura foi infundida no espectrômetro de massas para aquisição de espectros que foram denominados de “brancos” (Figura 9). O branco foi adquirido a cada lote de solução preparada e entre a aquisição das amostras (a cada 5 amostras) para verificação da presença de *carry-over* (acúmulo) nas peças do equipamento.

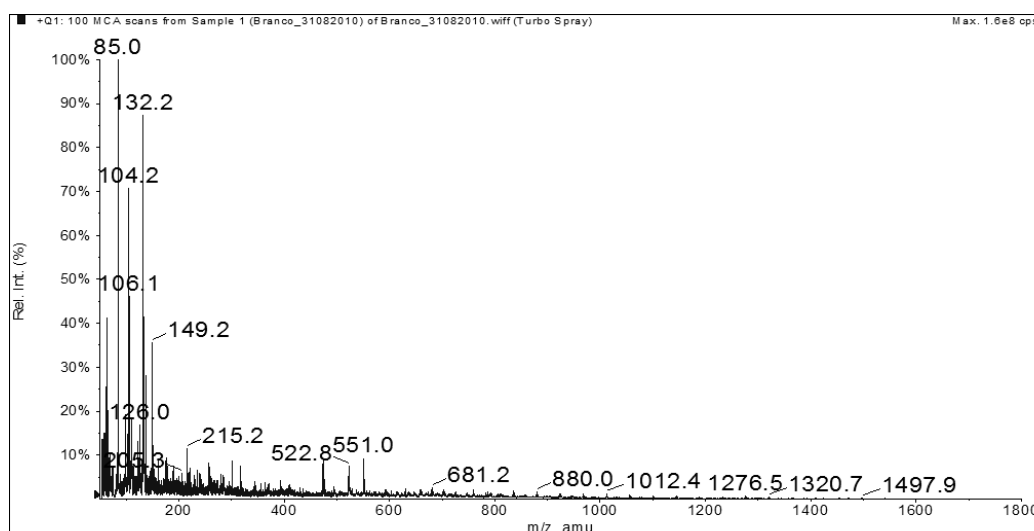


FIGURA 9 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR DIMS PARA A MISTURA ACETONITRILA/ÁGUA/ÁCIDO FÓRMICO (70:30:0,1) (v/v/v) (“BRANCO”)

#### 4.1.2 Precipitação das proteínas de alto peso molecular

A diversidade de componentes presentes em uma matriz biológica torna o tratamento das amostras absolutamente essencial uma vez que estes materiais contêm além dos metabólitos de interesse uma grande quantidade de interferentes. Como exemplo, a dinâmica faixa de concentração de proteínas de alto peso molecular (PAPM) presente nas amostras de plasma/soro torna a detecção das moléculas de baixo peso molecular bastante dificultada. Considerando que as moléculas de baixo peso molecular geralmente são as de interesse em estudos metabonômicos, o tratamento das amostras é estritamente necessário para reduzir ou remover os interferentes das amostras (CHERTOV *et al.*, 2004; MROZINSKI *et al.*, 2004; ROSENBLATT *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005; DEKKER *et al.*, 2007).

A aplicação de tecnologias ômicas na busca por potenciais biomarcadores em amostras de soro é limitada pela presença das proteínas de alto peso molecular, tais como a albumina e imunoglobulina, que constituem mais de 60% do total das proteínas do soro. A remoção destas proteínas de alto peso molecular auxiliam o descobrimento e detecção de proteínas menos abundantes que podem revelar-se marcadores informativos de doenças (CHEN *et al.*, 2005). Alguns trabalhos descrevem que a quase totalidade das moléculas de baixo peso molecular que servem como biomarcadores são complexadas às proteínas do soro de alto peso molecular, tais como a albumina. Existem diversos reagentes e protocolos utilizados atualmente que pré-fracionam e descartam as proteínas do soro de alta abundância, com a intenção de diminuir os seus efeitos de interferência. No entanto, muitos ou a maioria dos biomarcadores também podem estar sendo descartados. A associação das pequenas moléculas e proteínas com as proteínas transportadoras é realmente esperada, uma vez que sem uma associação com as grandes biomoléculas, as espécies menores seriam facilmente filtradas pelos rins, que funcionam como um filtro efetivo de pequenos peptídeos/proteínas e subprodutos metabólicos do sangue. Estudos de modelagem mostraram que, embora as afinidades entre os transportadores e os marcadores de pequeno porte sejam fracas, o grande excesso de transportadores, como albumina e imunoglobulina garantem uma interação constante entre os dois (ROSENBLATT *et al.*, 2004). Portanto, a diminuição das

---

proteínas de alto peso molecular deve ser realizada em condições que previnam a concomitante perda das moléculas e proteínas de baixo peso molecular (CHERTOV *et al.*, 2005).

Existem diversos procedimentos para remover as proteínas de alta abundância como a albumina. Para o esgotamento desta, os procedimentos mais simples são baseados na solubilidade das proteínas. Por exemplo, se o soro é misturado à cloreto de sódio ou etanol, há formação de um pequeno precipitado de proteínas, porém a maioria da albumina permanece no sobrenadante. O inconveniente destes métodos é a baixa seletividade porque as proteínas que se ligam à albumina e proteínas com solubilidade similar à da albumina podem não ser separadas. Já a adição de acetonitrila em soro, produz um “*pellet*” de proteínas, incluindo a albumina, enquanto que o sobrenadante se esgota nestas macromoléculas (VILLAR-GAREA; GRIESE; IMHOF, 2007). Ao longo dos anos, diversos autores resolveram explorar o uso de acetonitrila para precipitar proteínas de alta abundância do soro sanguíneo, supondo que em alguma concentração de acetonitrila o desejado grau de seletividade na solubilidade de grandes peptídeos e proteínas abundantes (incluindo os de baixo peso molecular) pudesse ser atingido (CHERTOV *et al.*, 2005).

No presente trabalho, a primeira etapa do desenvolvimento do método foi então avaliar o melhor solvente para a depleção das proteínas de alto peso molecular (PAPM). Para isso, diferentes protocolos de precipitação de proteínas foram realizados, incluindo o uso de solução a 60% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA), acetonitrila e solução de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). Ao término dos experimentos, foi observado que a utilização da solução a 60% (v/v) de TCA não promoveu uma adequada separação das proteínas e ainda um aspecto gelatinoso nas amostras foi observado. Consequentemente, as amostras não puderam ser infundidas no espectrômetro de massas.

O uso de acetonitrila somente melhorou significativamente a precipitação das PAPM com a produção de um sobrenadante transparente. No entanto, após infusão destas amostras no equipamento foi observada uma baixa intensidade de sinal dos íons entre  $m/z$  600 e 900 Da (Figura 10).

Comparativamente, o uso da solução de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de TFA promoveu uma rápida precipitação das PAPM com a formação de um

---

precipitado denso, facilmente removível por centrifugação. Além disso, uma melhora significativa de intensidade de sinal foi observada para os íons de  $m/z$  entre 600 e 900 Da (Figura 11). Portanto, a solução de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de TFA foi escolhida para ser utilizada no preparo das amostras de soro.

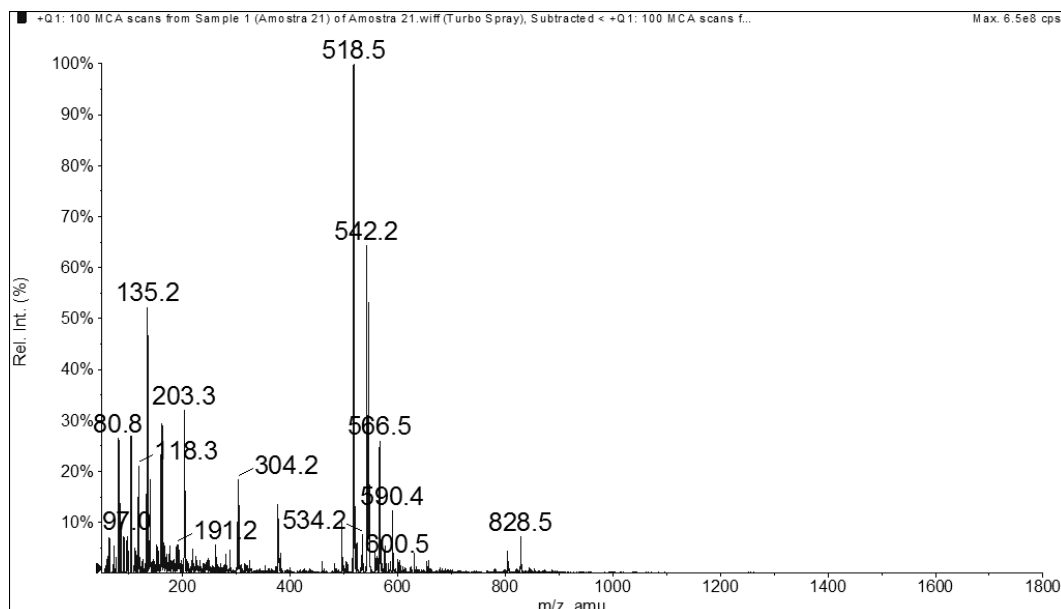


FIGURA 10 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO ATRAVÉS DE DIMS PARA UMA AMOSTRA DE SORO PRECIPITADA COM ACETONITRILA

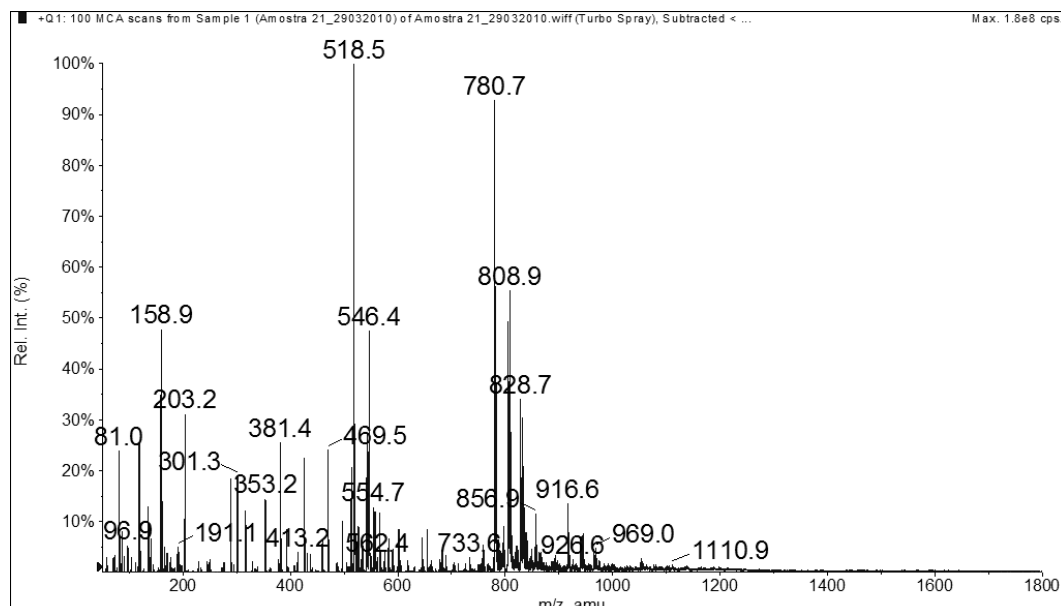


FIGURA 11 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO ATRAVÉS DE DIMS PARA UMA AMOSTRA DE SORO PRECIPITADA COM SOLUÇÃO DE ACETONITRILA CONTENDO 0,1% (v/v) DE TFA

## 4.2 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE MASSAS ADQUIRIDOS PARA AS ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Após o tratamento das amostras para precipitação das proteínas de alto peso molecular, foram realizadas as análises das amostras controles, amostras experimentais e da solução acetonitrila/água/ ácido fórmico (70:30:0,1) – “branco” – por meio da infusão direta por espectrometria de massas (DIMS).

Para cada amostra (grupo controle e grupo experimental) foi adquirido um espectro de massas, sendo detectada grande quantidade de íons na faixa analisada (entre 50 a 1800 Da). Aparentemente, os íons que apareceram no grupo controle são similares aos que apareceram nos grupos experimentais, em ambas as linhagens de camundongos utilizadas (Figuras 12A, 12B, 12C e 12D).

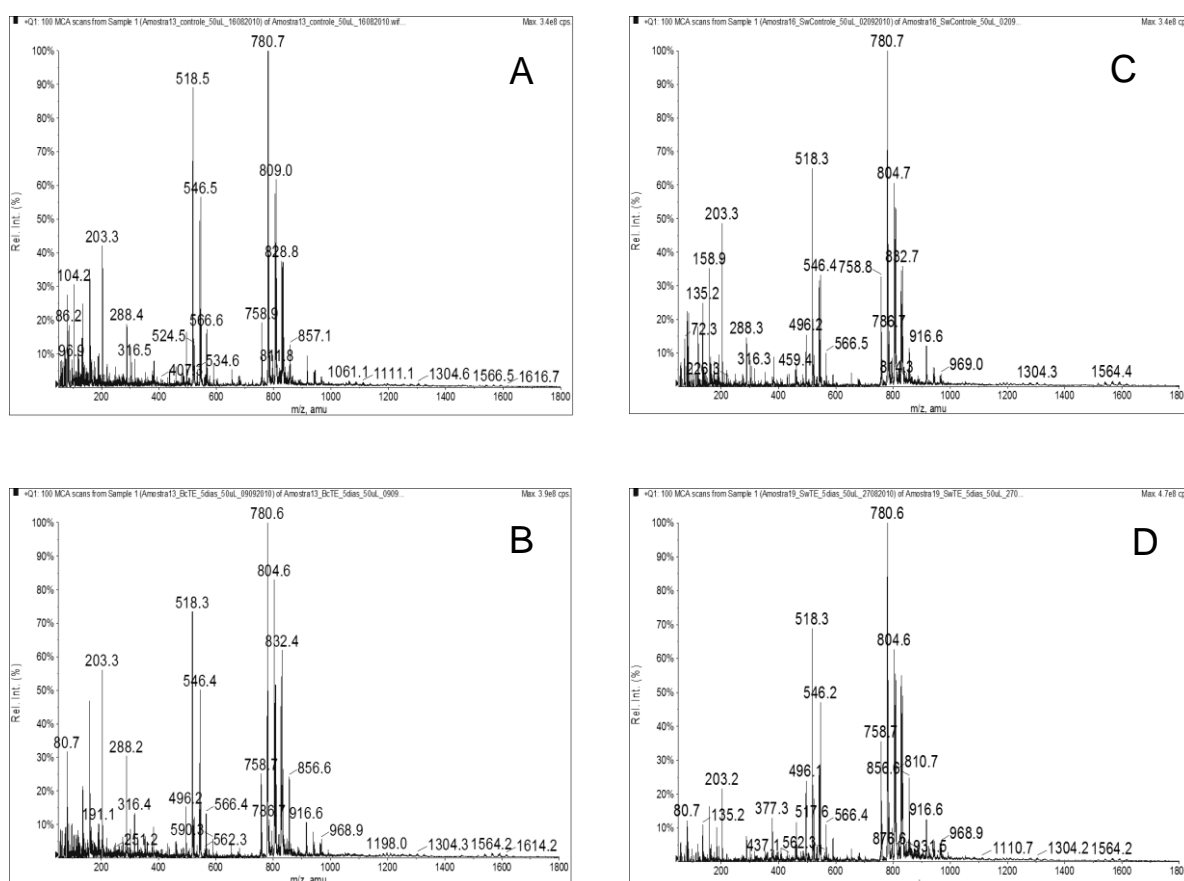


FIGURA 12 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR DIMS PARA UMA AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO. (A) BALB-C GRUPO CONTROLE, (B) BALB-C APÓS 5 DIAS DE INOCULAÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH, (C) SWISS GRUPO CONTROLE E (D) SWISS APÓS 5 DIAS DE INOCULAÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH



Portanto, dado a tamanha complexidade dos espectros de massas adquiridos, não foi possível realizar a distinção visual entre os grupos controle e experimental. Por este motivo, os dados obtidos pelas análises de DIMS foram avaliados por meio das análises quimiométricas (PCA e PLS).

A primeira etapa previamente às análises quimiométricas propriamente ditas, foi a subtração dos espectros de massas obtidos com os grupos experimental e controle daqueles obtidos com injeções de um branco (solução de acetonitrila/água/ácido fórmico, 70:30:0,1 v/v/v). Desta forma, uma vez que previamente às análises de DIMS as amostras foram ressuspensas na solução “branco” os sinais relacionados a esta solução foram subtraídos não influenciando, portanto, a interpretação dos resultados. Em seguida, devido a alguns íons de certa  $m/z$  serem detectados em uma dada amostra e não terem sido encontrados em outras amostras, após a subtração realizada, o software Analyst permite que sejam adicionados “zeros” nos locais onde estas determinadas  $m/z$  não foram evidenciadas. O objetivo deste procedimento foi para que as planilhas de dados ficassem todas do mesmo tamanho, pois somente assim elas poderiam ser carregadas e analisadas no Matlab. Finalmente, a planilha final de dados foi transferida para uma planilha do software Origin Pro 8 e organizada de modo que para cada amostra fossem correlacionados os valores de  $m/z$  adquiridos com a intensidade máxima do sinal detectado (%). A utilização do software Origin Pro 8 foi em função do mesmo conter a extensão ASCII necessária para importar dados no software Matlab.

Em seguida, os dados foram transferidos para o software Matlab, realizando-se uma análise exploratória preliminar por meio de uma rotina de análise de componentes principais (PCA). Diferentes tipos de pré-processamento e número de componentes principais (CPs) foram avaliados, objetivando-se discriminar os conjuntos de amostras controle e experimentais. Em geral, três tipos de pré-processamento (dados autoescalados, normalizados e centrados na média) permitiram a melhor diferenciação entre estes conjuntos (Figura 13), com destaque para dados centrados na média (Figura 13C), que permitiu uma notória discriminação fundamentada na primeira componente principal (CP1). Frente a estas considerações, as análises de componentes principais (PCA) foram realizadas por meio dos três pré-processamentos apresentados, porém, a melhor separação entre

---

os grupos controle e experimental foi observada quando os dados foram centrados na média. Por este motivo, optou-se trabalhar com dados centrados na média nas análises de componentes principais (PCA).

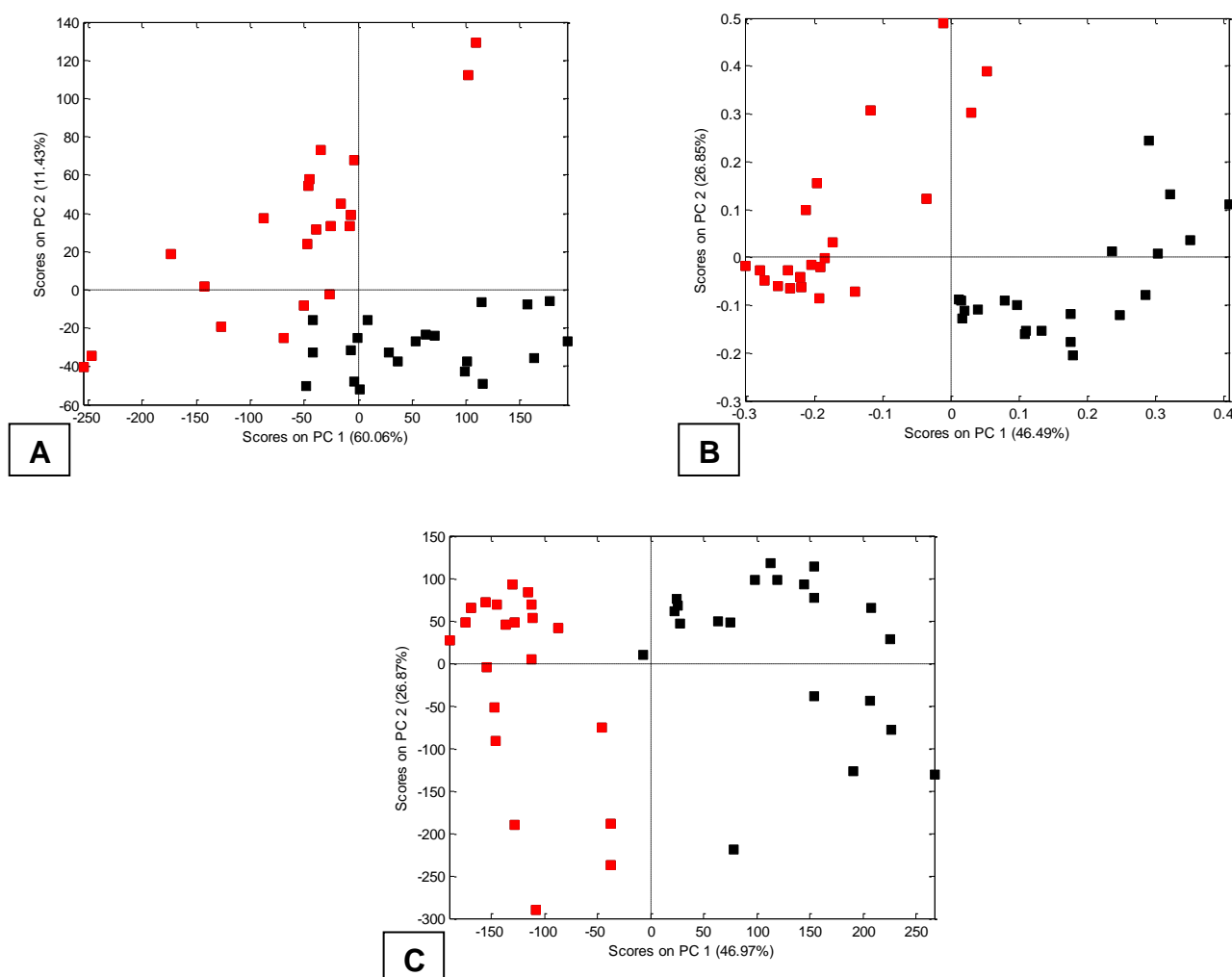


FIGURA 13 – GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS SWISS COLETADAS 5 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO TUMOR DE ERLICH: (A) AUTOESCALADO; (B) NORMALIZAÇÃO; (C) DADOS CENTRADOS NA MÉDIA. DADOS: (■) AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE; (■) AMOSTRAS DO GRUPO EXPERIMENTAL

#### 4.3 DIAGNÓSTICO DO TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS UTILIZANDO DIMS-PCA

A possível detecção do câncer em estágios iniciais significa o melhor prognóstico e tratamento da doença. Com o intuito de obter um diagnóstico precoce de câncer, camundongos Balb-C foram inoculados i.p. com uma suspensão de células tumorais de Ehrlich (TE) e a viabilidade do diagnóstico por DIMS-PCA foi avaliada. As análises do soro sanguíneo dos animais coletados em diferentes tempos do desenvolvimento da doença foram conduzidas no espectrômetro de massas, assim como as amostras controles (sem câncer). Uma grande quantidade de dados foi gerada, sendo impossível o seu processamento manual. Por este motivo, análises de componentes principais (PCA) foram realizadas para classificação das amostras em grupos experimentais e controle.

Em estudos que utilizam PCA, o objetivo principal é a diminuição da dimensionalidade da matriz de dados, sem perda de informações relevantes. Isto é, a análise consiste em manipular os dados da matriz X, de maneira a representar as variações presentes em muitas variáveis através de um número menor de fatores. Desta forma, a PCA produz combinações lineares das variáveis originais para dar origem a um novo sistema de eixos, que recebe o nome de componentes principais (CPs) e que permite a visualização da natureza multivariada dos dados em poucas dimensões. Considerando que para cada amostra de soro adquirida no espectrômetro de massas foram detectados em torno de 17.000 íons é notória a necessidade de compressão destes dados para uma avaliação dos mesmos.

As coordenadas de cada uma das amostra no espaço definido pelas CPs são denominadas de *scores* (FERREIRA *et al.*, 1999), parâmetro útil para a avaliação de semelhanças e diferenças. Uma vez que os *scores* representam a disposição das amostras no novo sistema de coordenadas, fornecendo um resumo de todas as observações referentes às amostras e, ainda, apontando agrupamentos, tendências e amostras anômalas, a sua análise permite relacionar as amostras de forma que aquelas que estão próximas umas das outras possuem um perfil semelhante, enquanto aquelas que se distanciam possuem propriedades diferentes (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007).

---

Para ilustrar o anteriormente exposto apresenta-se na Figura 14 um gráfico de *scores*, resultante do processamento de um conjunto de 20 espectros de massas, correspondentes a 17 camundongos sadios. Em primeiro lugar, é importante destacar que aproximadamente 60% da variância dos dados originais pode ser representada por um conjunto de apenas duas CPs, cada uma delas, em função do seu caráter ortogonal, explica variâncias complementares. A distribuição das amostras no espaço definido pelas CPs sugere que, mesmo se tratando de amostras de um mesmo conjunto (camundongos sadios), existem diferenças associadas tanto à CP1 como à CP2, o que necessariamente implica em diferenças no sinal monitorado (17.000 valores de  $m/z$ ).

Adicionalmente, é importante destacar que análises realizadas em duplicata (amostras circuladas) também apresentam diferenças de localização no espaço definido pelas CPs, o que sugere a ocorrência de desvios associados à complexidade da matriz em estudo. As amostras em destaque mostradas na Figura 14 representam as duplicatas e foram analisadas partindo-se de duas alíquotas de 50  $\mu$ L de soro de um mesmo camundongo preparadas conforme o item 3.7.

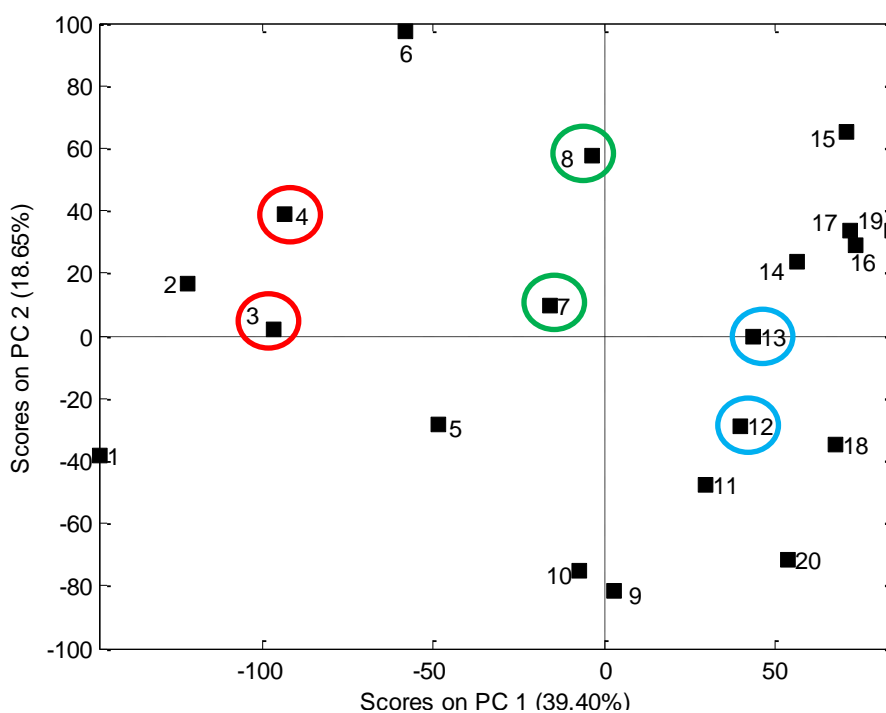


FIGURA 14 – GRÁFICO DE SCORES OBTIDOS PARA AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS BALB-C SADIOS (CONTROLES). AMOSTRAS CIRCULADAS SÃO REFERENTES ÀS DUPLICATAS

Uma vez que a redução da dimensionalidade da matriz é um dos objetivos em análises de PCA, a primeira análise a ser considerada antes dos gráficos de *scores* propriamente ditos é quantas componentes principais devem ser investigadas e quantas devem ser ignoradas. Para isso, existem alguns critérios: o primeiro é ignorar as CPs no ponto em que a próxima componente principal (CP) oferece pequeno aumento na variância acumulada explicada (*Eigenvalues*). Um segundo critério é incluir todas as CPs até uma porcentagem de variância total explicada pré-determinada, por exemplo 90%. Um terceiro critério é ignorar as CPs cuja variância explicada é inferior a 1% quando uma matriz de correlação é utilizada ou menos do que a variância média explicada quando uma matriz de covariância é utilizada, com a idéia de que tais componentes oferecem pouca informação. O quarto critério é ignorar as últimas CPs cujos valores de variância explicada são praticamente iguais (FERREIRA *et al.*, 1999).

Nos experimentos realizados neste trabalho, a escolha do número de CPs a serem investigadas foram escolhidas em função do gráfico de *Eigenvalues* versus número de CPs, ou seja, a partir de uma determinada componente não existe aumento significativo da variância total explicada, determinando, portanto, o número de CPs escolhidas. A Figura 15 mostra um exemplo da escolha do número de CPs quando analisado o gráfico de *Eigenvalues* para as amostras do grupo de camundongos Balb-C após 3 dias da inoculação com TE. Como pode ser visualizado, um total de 20 CPs foram construídas para explicar a totalidade dos dados originais, porém, observa-se que a partir da quinta CP (CP5) não existe um acréscimo significativo na variância acumulada explicada, ou seja, com cinco CPs é possível explicar cerca de 86% da variância acumulada, enquanto que a partir da sexta CP (CP6) o aumento da variância acumulada é pouco significativo (dados mostrados na tabela).

---

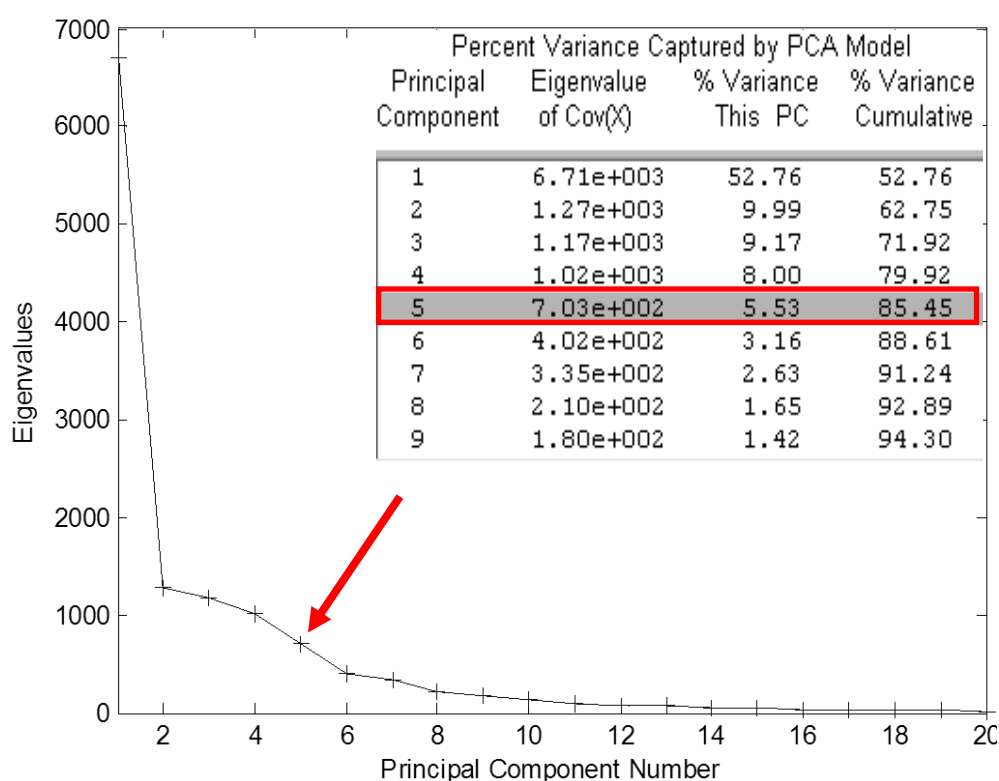


FIGURA 15 – GRÁFICO DE *EIGENVALUES* VERSUS NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Portanto, para cada análise de PCA realizada em ambas as linhagens de camundongos inoculados com TE, um determinado número de componentes principais foi selecionado. Em geral, podem ser calculadas tantas CPs quanto o número de variáveis originais. O objetivo, no entanto, é selecionar um pequeno número delas, com capacidade para explicar a maior parte da variação dos dados. A Tabela 2 mostra o número de CPs escolhidas para cada análise de PCA em cada linhagem, bem como as respectivas porcentagens de variância acumulada explicadas.

TABELA 2 – NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS INVESTIGADAS NA PCA REALIZADA PARA AS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS INOCULADAS COM CÉLULAS TUMORAIS DE EHRlich. DADOS CENTRADOS NA MÉDIA

BALB-C			SWISS	
	n° CPs	Variância Acumulada (%)	n° CPs	Variância Acumulada (%)
Após 1 dia	4	92,93	-	-
Após 2 dias	5	92,81	-	-
Após 3 dias	6	88,61	3	79,84
Após 5 dias	3	81,71	6	88,52
Após 7 dias	6	89,51	6	81,64
Após 10 dias	6	92,07	5	82,98

Definido, portanto o número de CPs a ser investigado, o próximo passo foi a construção dos gráficos de *scores* obtidos a partir dos espectros de massas dos grupos experimental e controle de ambas as linhagens de camundongos (Balb-C e Swiss) nos diferentes estágios de desenvolvimento do tumor de Ehrlich. O objetivo, neste caso, foi o de observar as amostras no espaço dimensional reduzido e a possível diferenciação entre estes grupos em estágios iniciais do desenvolvimento do tumor. Quando gráficos de *scores* são analisados, as observações devem ser realizadas em relação a distribuição das amostras no sistema de coordenadas (CPs) e em relação a quais CPs estão sendo analisadas, bem como o quanto da variação acumulada elas representam. Percebe-se que cada coordenada (CP) é traçada a partir do ponto zero e desta forma o gráfico fica dividido em quadrantes os quais ficam delimitados pelos valores positivos e negativos de cada CP (Figura 16 e 17).

#### 4.3.1. Gráficos de scores para os camundongos Balb-C inoculados com TE

A Figura 16 mostra os gráficos de scores para as amostras da linhagem Balb-C obtidos 1, 2, 3, 5, 7 e 10 dias após a indução do TE. A matriz utilizada para a construção dos gráficos de scores após 1 e 2 dias constou de 15 colunas (soro de cada camundongos) e 17.505 linhas ( $m/z$  na faixa analisada) enquanto para os gráficos após 3, 5, 7 e 10 dias foram utilizadas 19 colunas e 17505 linhas. É possível observar que as amostras obtidas após 1 e 2 dias da indução das TE não puderam ser diferenciadas (Figura 16A e 16B). A partir do terceiro dia, é nítida a separação entre os grupos controle e experimental (Figura 16C), sendo evidenciada também a diferenciação dos grupos nos outros dias analisados (Figuras 16D, 16E e 16F).

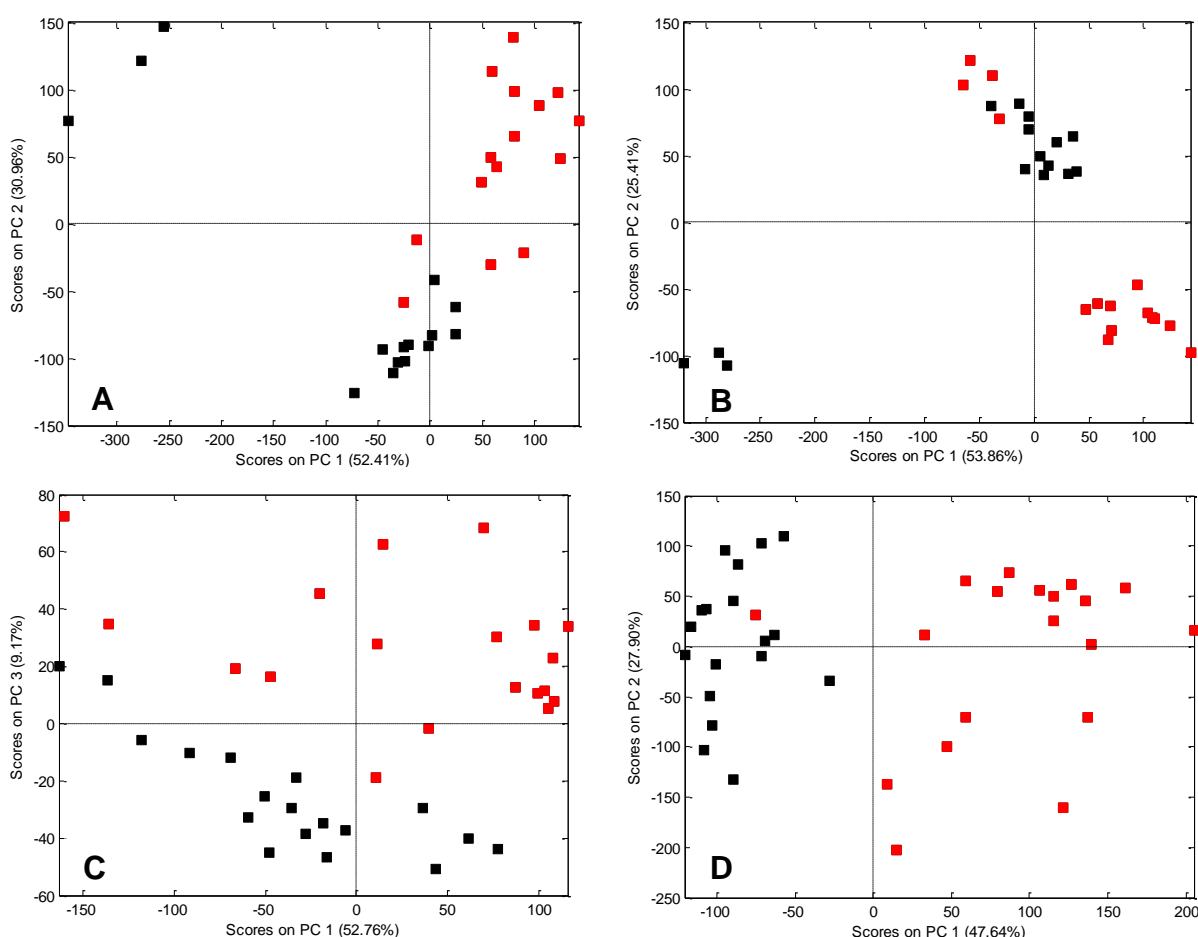


FIGURA 16 – GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS BALB-C OBTIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRlich: (A) 1 DIA, (B) 2 DIAS, (C) 3 DIAS E (D) 5 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO TE. DADOS: (■) AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE; (■) AMOSTRAS DO GRUPO EXPERIMENTAL



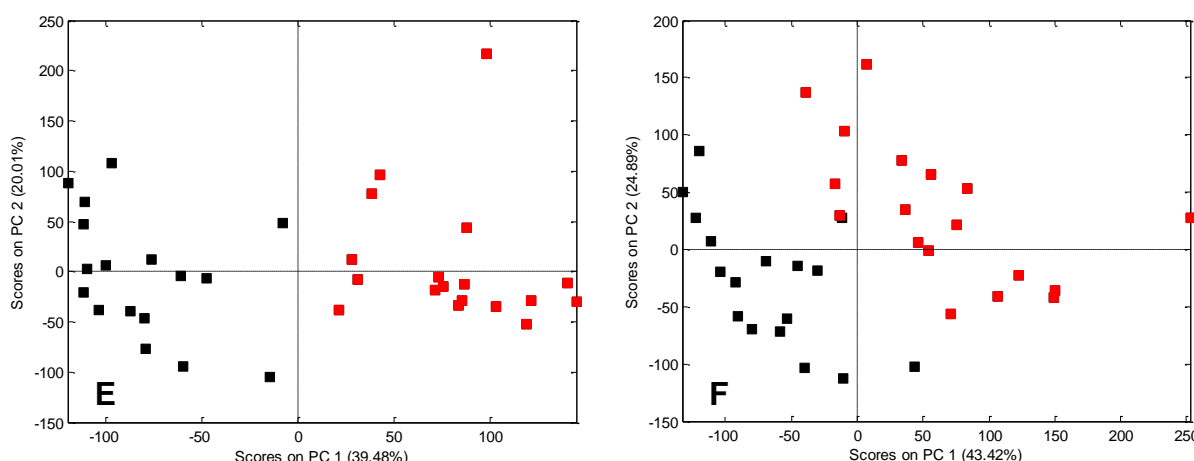


FIGURA 16 CONTINUAÇÃO – GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS BALB-C OBTIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH: (E) 7 DIAS E (F) 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO TE. DADOS: (■) AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE; (■) AMOSTRAS DO GRUPO EXPERIMENTAL

Avaliando as CPs apresentadas nos gráficos de *scores* para a linhagem Balb-C com TE, é possível verificar que, nas amostras após 3 dias da inoculação com TE, foram necessárias três CPs para demonstrar a separação entre o grupo controle e experimental, as quais explicaram cerca de 62% da variância acumulada da matriz X. O mesmo acontece quando observamos os experimentos após 5, 7 e 10 dias, ou seja, duas CPs fizeram a diferenciação das amostras, explicando cerca de 76%, 60% e 68% da variância acumulada da matriz X, respectivamente.

Observa-se ainda na Figura 16 que no grupo após 3 dias de inoculação com TE realizadas na linhagem Balb-C, a terceira componente principal (CP3) é quem está fazendo a diferenciação das amostras, isto é, as amostras referentes aos camundongos sadios (controles) estão do lado negativo de CP3, enquanto as amostras referentes ao grupo com câncer estão do lado positivo de PC3 (Figura 16A). Da mesma forma, para as amostras após 5, 7 e 10 dias, quem está fazendo a diferenciação das amostras é a primeira CP (CP1), pois as amostras com câncer encontram-se do lado positivo de CP1. A importância em se estabelecer qual CP está permitindo a diferenciação entre as amostras é em função da próxima etapa do estudo, ou seja, a construção dos gráficos de *loadings*, os quais irão indicar os íons responsáveis pela diferenciação das amostras.

É importante dizer que os grupos após 1 e 2 dias da indução com TE em camundongos Balb-C, foram considerados somente após o êxito das análises em 3

dias, ou seja, quando foi verificado que era possível obter uma diferenciação entre os grupos no período após 3 dias de inoculação, as investigações foram canalizadas para uma possível detecção mais precoce ainda. Frente ao resultado apresentado, isto é, a não diferenciação entre grupos controle e experimental, os experimentos de 1 e 2 dias não foram realizados na linhagem Swiss, pois não se justificaria a utilização de um número maior de animais frente a resultados de baixa perspectiva.

#### 4.3.2 Gráficos de scores para os camundongos Swiss inoculados com TE

A Figura 17 mostra os gráficos de scores obtidos para as amostras da linhagem Swiss após 3, 5, 7 e 10 dias da indução com TE. Da mesma maneira como observado na linhagem Balb-C, foi possível verificar uma diferenciação entre os grupos controle e experimental após 3 dias da inoculação com TE. Duas CPs foram utilizadas para diferenciar as amostras após 3, 5, 7 e 10 dias da indução do câncer, correspondendo a 74%, 73%, 62% e 66% da variância acumulada da matriz X, respectivamente. Pode-se dizer então que mesmo frente a um sistema biológico, onde existem diferentes variáveis, foi possível explicar a maior parte da variância dos dados originais com um número mínimo de CPs.

As Figuras 17A, 17B e 17C permitem verificar que nos experimentos após 3, 5 e 7 dias, respectivamente, a componente responsável pela separação entre os grupos controle e experimental é a CP1. Enquanto nos grupos analisados após 3 e 5 dias, as amostras com câncer estão do lado negativo da CP1, no grupo após 7 dias elas estão no lado positivo da CP1. Já as amostras após 10 dias, estão posicionadas no lado negativo da CP2, demonstrando a importância desta componente na diferenciação (Figura 17D).

---

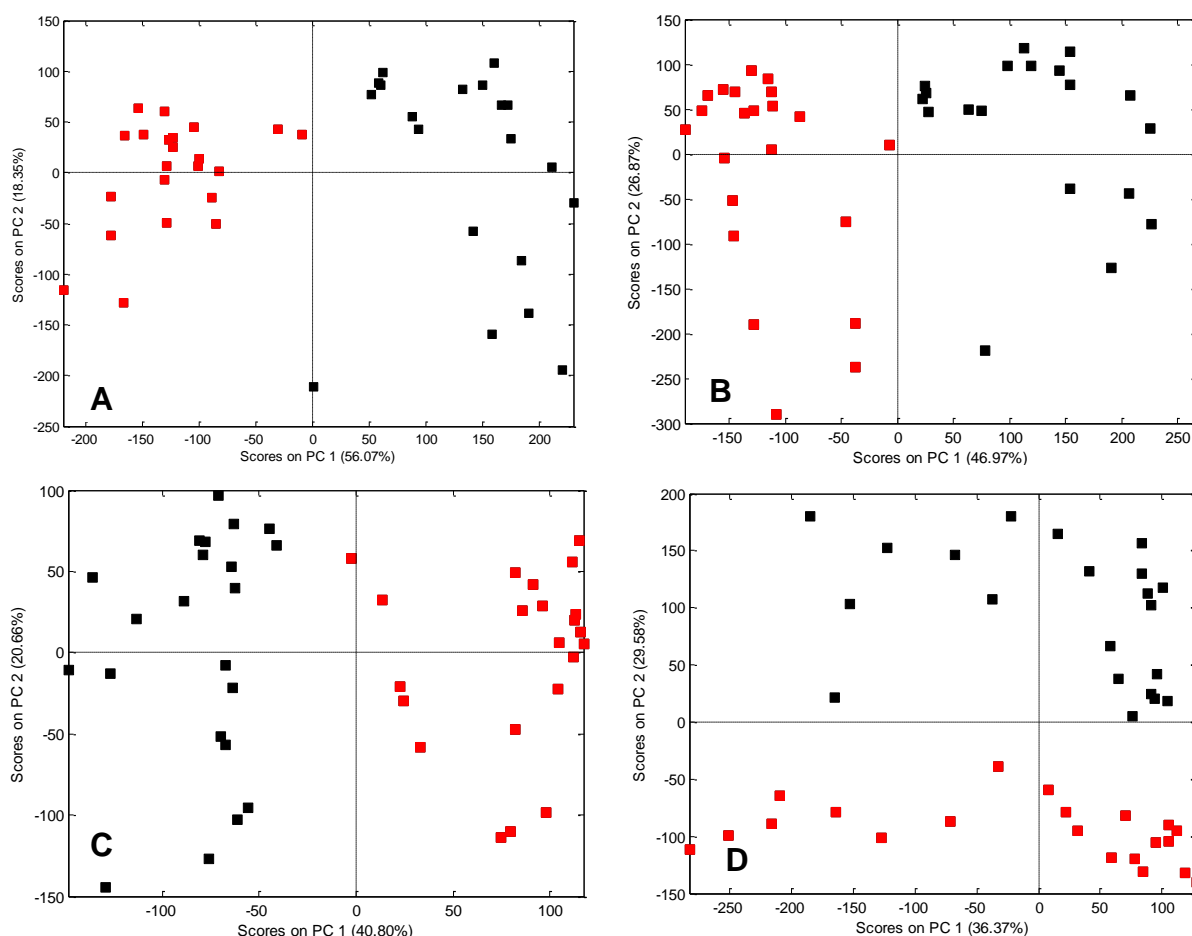


FIGURA 17 – GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS SWISS OBTIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH: (A) 3 DIAS, (B) 5 DIAS, (C) 7 DIAS E (D) 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO TE. DADOS: (■) AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE; (■) AMOSTRAS DO GRUPO EXPERIMENTAL

Em virtude do baixo número de CPs utilizados para separar os grupos experimentais e controle, tanto na linhagem Balb-C quanto na linhagem Swiss inoculados com TE, pode-se dizer que os íons responsáveis pela diferenciação não se encontram em detalhes dos espectros de massas, ou seja, uma vez que os dados foram centrados na média, a separação ocorreu em virtude dos íons de maior intensidade.

Portanto, a análise dos gráficos de *scores* apresentados para ambas as linhagens de camundongos inoculadas com TE, permite dizer que após 3 dias da indução foi observada uma considerável diferenciação entre os grupos controle e experimental. Considerando que o tempo de sobrevivência dos animais inoculados com TE foi de  $15 \pm 1$  dia para a linhagem Balb-C e  $18 \pm 1$  dia para a linhagem Swiss, a

detecção do câncer após 3 dias da indução das células tumorais foi considerada um excelente resultado uma vez que correspondeu a 1/5 (um quinto) e 1/6 (um sexto) do tempo de sobrevida médio dos camundongos doentes, respectivamente. Silva e colaboradores (2010) realizaram um estudo similar, com a indução do tumor de Ehrlich nas mesmas linhagens de camundongos, porém as análises dos soros sanguíneos foram realizadas através RMN. Os resultados das análises de PCA dos pesquisadores demonstraram que, em ambas as linhagens, o diagnóstico da doença foi alcançado somente sete dias após a sua inoculação. Este resultado correspondeu a 1/3 (um terço) do tempo de sobrevida médio dos animais ( $21,0 \pm 2,65$  dias), ou seja, a doença foi diagnosticada em um estágio avançado do tumor, onde os camundongos já se encontravam bastante debilitados (SILVA, 2010).

Considerando que normalmente, a especificidade está relacionada com a fração de amostras não doentes diagnosticadas como tal enquanto a sensibilidade com a fração de amostras doentes, os resultados obtidos demonstraram a especificidade e sensibilidade do método de DIMS-PCA na diferenciação de grupos de forma precoce.

Em seguida, foi avaliada a possibilidade de visualização da evolução da doença por meio de um gráfico de *scores* plotado em função de amostras obtidas 3, 5, 7 e 10 dias após a inoculação com TE. Para isso, uma matriz X foi construída contendo todas as amostras obtidas após a inoculação com TE em camundongos Swiss ( $n = 52$ ) sendo os dados, desta vez, autoescalados (Figura 18). Sendo assim, após selecionar 6 CP's, as quais explicaram 79,64% da variância acumulada da matriz X, foi possível perceber a evolução da doença quando plotadas CP3 *versus* CP5. Este resultado sugeriu a possibilidade de realizar uma modelagem dos dados obtidos para construção de modelos de predição da doença e, portanto, as análises de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foram realizadas para as duas linhagens inoculadas com TE, mostradas nos itens 4.3.4 e 4.3.5. É importante dizer que ao utilizar os dados centrados na média não foi possível demonstrar a evolução da doença e, por este motivo, optou-se por desenvolver o PLS com dados autoescalados.

---

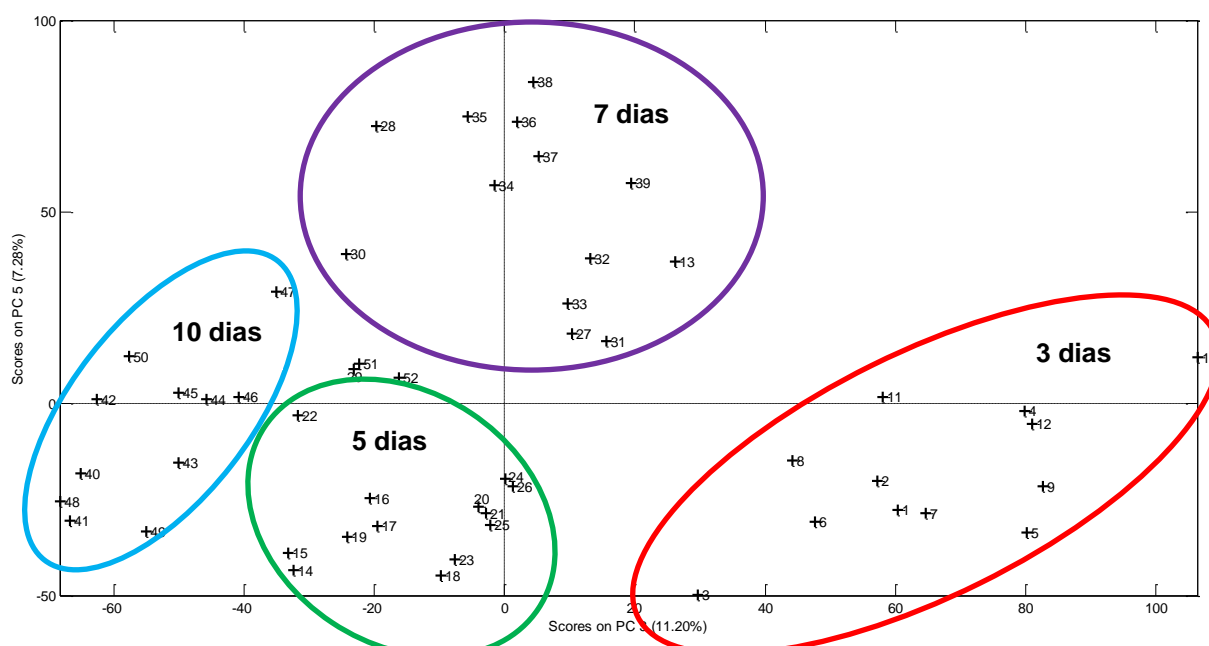


FIGURA 18 – GRÁFICO DE SCORES OBTIDO PARA ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO TUMOR DE EHRlich EM CAMUNDONGOS SWISS

#### 4.3.3. Gráficos de Influências (*loadings*) para as linhagens Balb-C e Swiss inoculadas com Tumor de Ehrlich (TE)

Após a análise dos gráficos de *scores*, foram construídos os gráficos de *loadings* de cada CP responsável pela diferenciação das amostras das linhagens Balb-C e Swiss inoculadas com TE. O objetivo desta etapa foi avaliar os íons que mais contribuíram para distinguir os grupos experimentais e controle. Desta forma, os gráficos de *loadings* foram construídos em função da CP que permitiu a diferenciação entre os grupos, ou seja, para as amostras da linhagem Balb-C após 3 dias de inoculação foram plotados os gráficos de *loadings* da CP3, enquanto para as amostras após 5, 7 e 10 dias, *loadings* da CP1. Para a linhagem Swiss, foram plotados gráficos de *loadings* da CP1 para as amostras após 3, 5 e 7 dias da inoculação do TE e *loadings* da CP2 para as amostras após 10 dias.

Os gráficos de *loadings* representativos dos grupos Balb-C e Swiss 3 dias após a indução do TE estão demonstrados na Figura 19. É possível observar que, devido aos dados serem centrados na média, os gráficos de *loadings* apresentam uma imagem um pouco diferente dos espectros de massas adquiridos, com sinais tanto no lado positivo quanto negativo das CPs e, além disso, o eixo x apresenta a

contagem de variáveis que pode ser interpretada ou substituída pelos valores de  $m/z$ . Isso é devido ao pré-processamento de dados aplicado sobre as variáveis originais previamente à PCA. Portanto, o eixo x do gráfico de *loadings* corresponde ao peso das variáveis originais envolvidas na análise de PCA, neste caso, os íons de relação  $m/z$  adquiridos no espectrômetro de massas. Já o eixo y mostra os lados positivos e negativos dos pesos da CP envolvida. Para definir então os íons responsáveis pela diferenciação entre os grupos foi necessário selecionar cada um dos picos que apareciam em maior intensidade no lado positivo ou negativo da CP envolvida e com o valor fornecido voltar na planilha do Origin utilizada para a construção da matriz X para encontrar o íon correspondente. A partir disso, foi possível então definir os íons que se destacaram e permitiram a diferenciação entre o grupo experimental e o grupo controle.

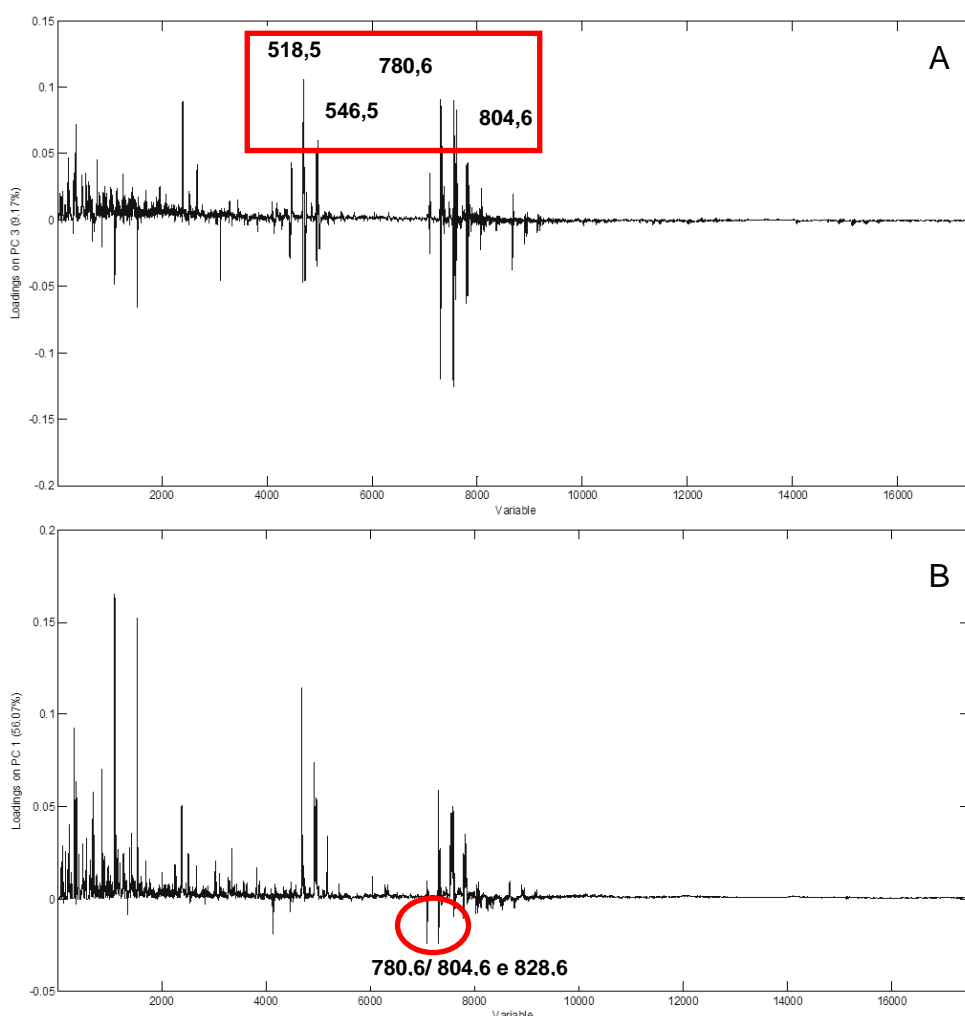


FIGURA 19 – GRÁFICO DE *LOADINGS* OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE SORO APÓS 3 DIAS DA INDUÇÃO DO TUMOR DE EHRlich: (A) BALB-C, *LOADINGS* DE CP3 E (B) SWISS, *LOADINGS* DE CP1

Para os camundongos Balb-C 3 dias após a inoculação com TE, observa-se que os íons apresentados no gráfico de *loadings* que foram mais relevantes e permitiram a separação dos grupos experimental e controle foram os de  $m/z$  518,5; 546,5; 780,6 e 804,6 Da (Figura 19A), pois são os íons que apareceram em maior intensidade de *loadings* no lado positivo da CP3. Nos experimentos após 5, 7 e 10 dias da inoculação, foram analisados *loadings* positivos de CP1, no entanto, os mesmos íons apareceram, com a contribuição adicional dos íons de  $m/z$  828,6 e 832,5 Da (Figura 20 A, B e C).

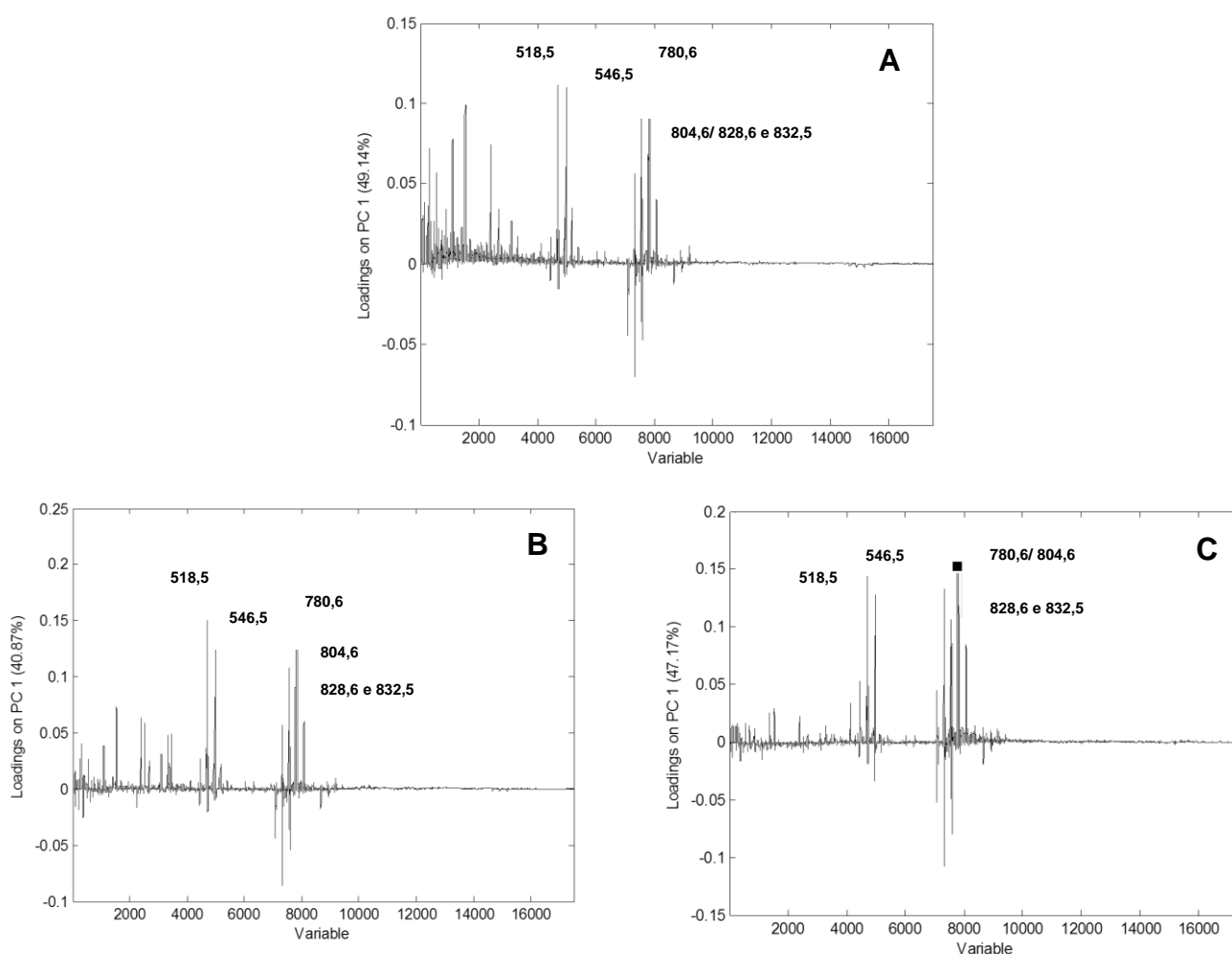


FIGURA 20 – GRÁFICOS DE *LOADINGS* DAS AMOSTRAS COLETADAS DOS CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM O TUMOR DE ERLICH: (A) 5 DIAS; (B) 7 DIAS E (C) 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TE

Para os camundongos Swiss, o gráfico de *loadings* apresentado na Figura 19B, mostra que após 3 dias da inoculação do tumor os íons mais representativos no grupo experimental foram os de  $m/z$  780,6; 804,6 e 828,6 Da. Estes íons também foram encontrados quando analisados os gráficos de *loadings* positivo e negativo de CP1 das amostras após 5 e 7 dias, respectivamente (Figuras 21A e B); enquanto nos experimentos após 10 dias foi observada a contribuição também do íon 856,8 Da, quando analisado o gráfico de *loadings* negativos de CP2 (Figuras 21C).

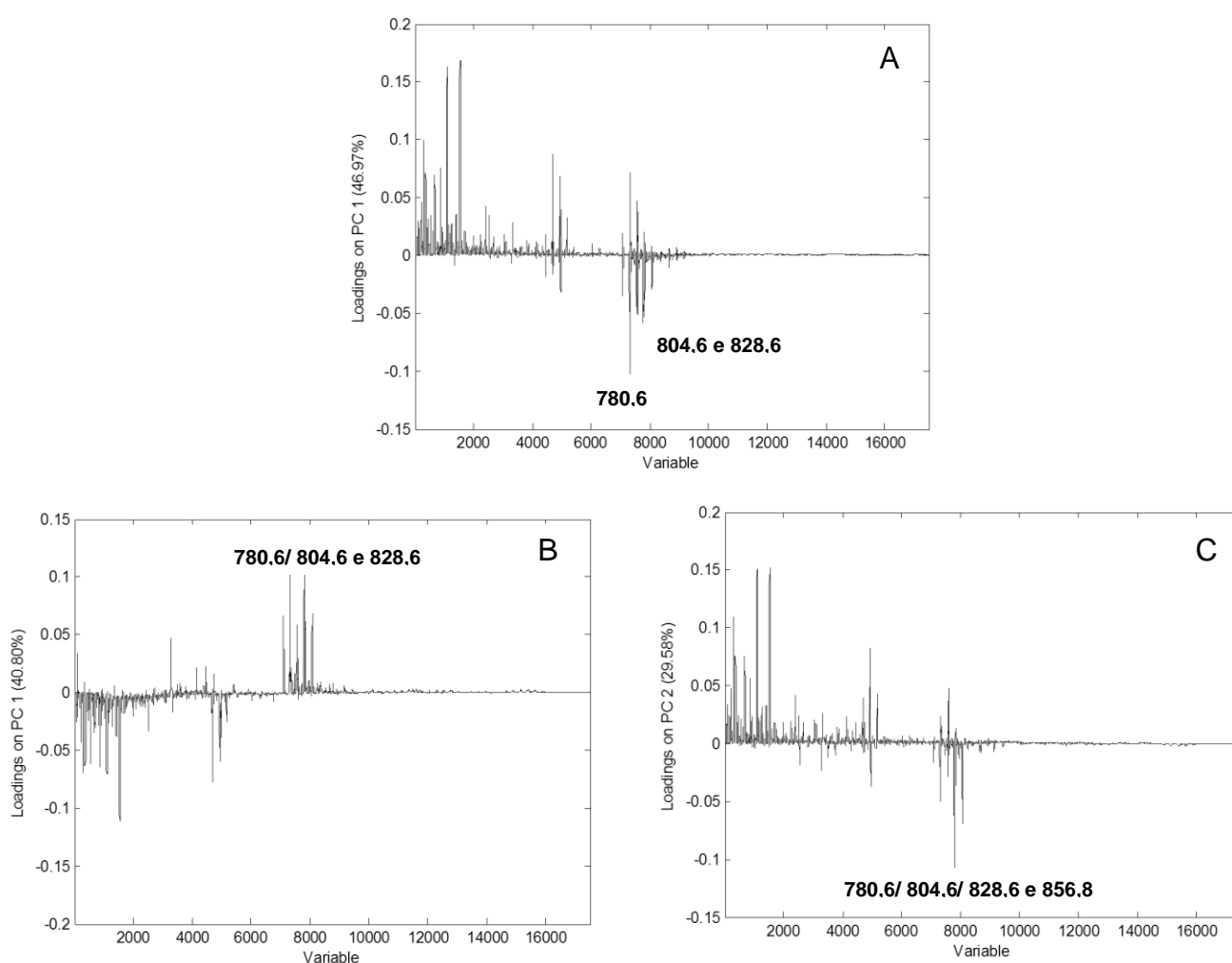


FIGURA 21 – GRÁFICOS DE *LOADINGS* DAS AMOSTRAS COLETADAS DOS CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM O TUMOR DE ERLICH: (A) 5 DIAS; (B) 7 DIAS E (C) 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DO TE



Dados da literatura vêm demonstrando que a presença de um tumor aumenta consideravelmente os níveis de fosfolipídios e mediadores químicos da resposta inflamatória (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; COUSSENS; WERB, 2002; AGGARWAL *et al.*, 2006; KONTOS *et al.*, 2009). No presente estudo, foi possível perceber que, para ambas as linhagens inoculadas com TE, em todos os dias analisados os íons destacados como de maior relevância para diferenciação entre grupo com câncer e grupo controle foram os íons compreendidos na faixa entre  $m/z$  500 a 850 Da. Estes íons são relacionados à classe dos fosfolipídios, amplamente estabelecidos na caracterização de neoplasias (ACKERSTAFF; GLUNDE; BHUJWALLA, 2003).

Ao término das avaliações dos experimentos realizados com TE inoculadas em camundongos Balb-C e Swiss, foi possível afirmar que o método DIMS-PCA permitiu a classificação precoce das amostras em grupos experimentais (com câncer) e controle (sem câncer). Além disso, os íons responsáveis pela diferenciação puderam ser evidenciados e, ainda, foi possível observar uma evolução da doença. Portanto, a próxima etapa do estudo foi modelar os dados obtidos para este tipo de célula tumoral e tentar prever amostras desconhecidas nas duas linhagens de camundongos utilizadas.

#### 4.3.4 Análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) para os camundongos Balb-C inoculados com TE

O princípio da análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) é a construção de um modelo linear que correlaciona dois grupos de dados. A primeira etapa da construção do modelo de calibração multivariada trata da aquisição de respostas instrumentais para uma série de amostras as quais são arranjadas em uma matriz  $X$  e os valores de referência da propriedade de interesse em um vetor  $y$ . Desta forma, os espectros de massas obtidos em um conjunto de experimentos (conjunto de calibração) foram utilizados para prever novas observações (conjunto de validação) em relação a estágios de desenvolvimento da doença em dias.

Neste sentido, para a construção do modelo de predição em camundongos Balb-C inoculados com TE, o conjunto de calibração (matriz  $X$ ,  $n = 67$ ) foi montado

---

da seguinte forma: grupo controle ( $n = 13$ ), grupo após 3 dias ( $n = 13$ ), grupo após 5 dias ( $n = 14$ ), grupo após 7 dias ( $n = 14$ ) e grupo após 10 dias ( $n = 13$ ). Os dados da matriz  $X$  foram organizados de maneira que cada coluna representou um camundongo e cada linha os respectivos valores de intensidade máxima (%) para cada valor de  $m/z$  adquirido. O vetor  $y$  foi disposto de maneira que as amostras controle receberam o valor 0 (zero), as amostras de 3 dias receberam o valor 3, as amostras de 5 dias o valor 5, as amostras de 7 dias o valor 7 e as amostras de 10 dias o valor 10. O conjunto de calibração foi analisado através do pré-processamento autoescalado para a matriz  $X$  e para o vetor  $y$ , regressão NIPLS e validação cruzada *Venetian blinds*.

Como realizado na PCA, inicialmente foi necessário verificar quantas CP, neste caso denominadas variáveis latentes (VL), devem ser analisadas para comporem o conjunto de calibração. Para isso, o gráfico da raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (RMSECV) *versus* número de VL foi plotado e foram avaliados os dados de erros da validação cruzada, os quais devem ser os menores possíveis (Figura 22). Desta forma, 8 VL demonstraram baixos erros de validação cruzada e ainda foram capazes de explicar aproximadamente 81% da variância acumulada da matrix  $X$  e 99% da variância acumulada do vetor  $y$ .

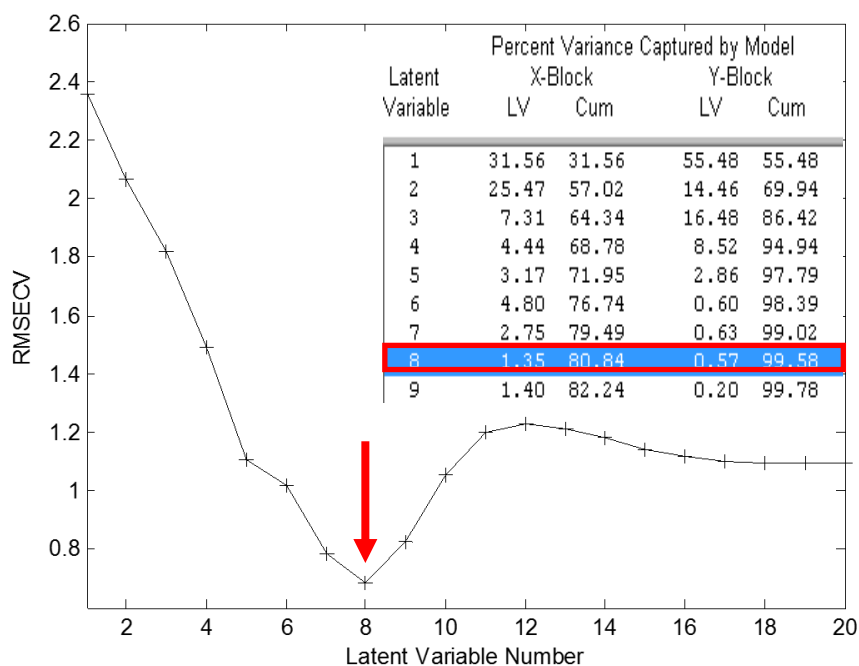


FIGURA 22 – GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM TE

Escolhido o número de VL, o próximo passo foi a verificação da presença de amostras anômalas. A presença desse tipo de amostra no conjunto de calibração fornece modelos com altos valores de erro e, portanto, baixa capacidade de previsão. Nesse sentido, foi plotado o gráfico de *leverage* versus resíduos de Students (Figura 23). Uma amostra foi considerada anômala em *leverage* (amostra nº 41), uma vez que ela ficou acima do valor de *leverage* calculado ( $L = 3 \times VL/n = 3 \times 8/67 = 0,36$ ).

Os valores de *leverage* são uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Normalmente, descartam-se somente as amostras que apresentam anomalias tanto por *leverage* quanto por resíduo de Students, pois seria necessário uma VL para explicar somente esta amostra. Portanto, devido a robustez das análises de PLS a amostra considerada anômala não foi excluída do conjunto de calibração.

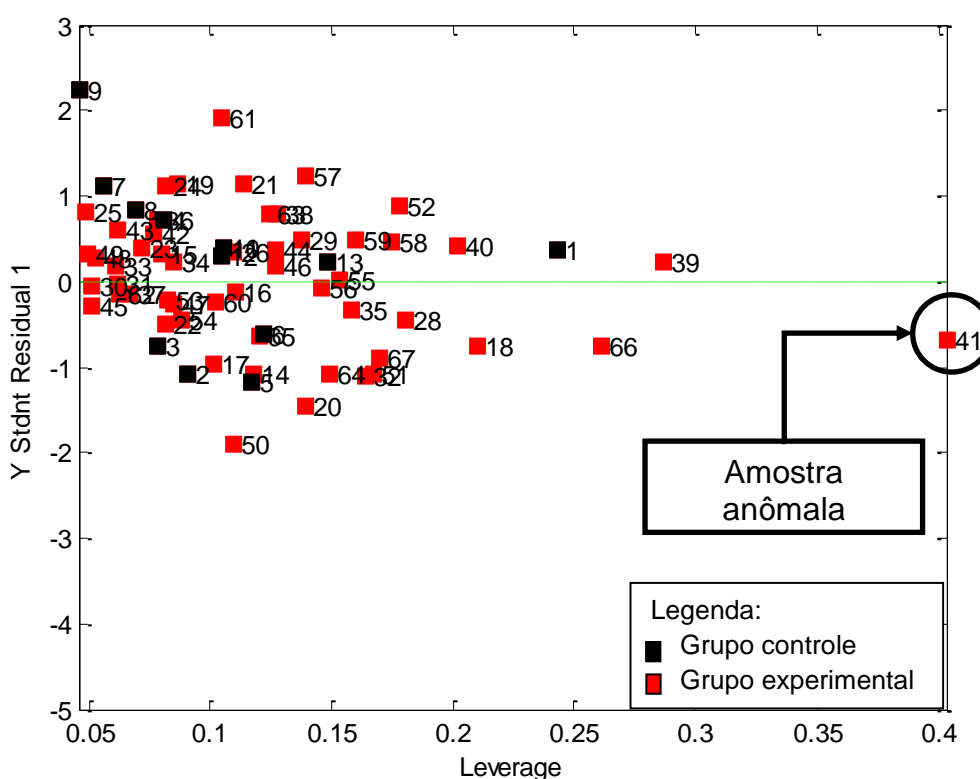


FIGURA 23 – GRÁFICO DE *LEVERAGE* VERSUS RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 8 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM TE

Em seguida, para avaliar a consistência do modelo de calibração construído, foi plotado o gráfico de valores medidos *versus* valores preditos (Figura 24). A análise deste gráfico foi realizada através do valor obtido para a raiz quadrada do erro médio de calibração (RMSEC). Quando valores de RMSEC são avaliados, o desejado é que este valor seja o menor possível, de preferência, menor que 1 (um), o que indica que o modelo é capaz de prever corretamente e com segurança as próprias amostras. Conforme pode ser observado na Figura 24, o valor de RMSEC obtido foi de 0,21667 e, portanto, concluiu-se que a presença da amostra anômala não afetou a capacidade de predição das amostras pertencentes ao conjunto de calibração. Sendo assim, o modelo com 8 VL foi considerado um bom modelo para ser aplicado à previsão de novas amostras.

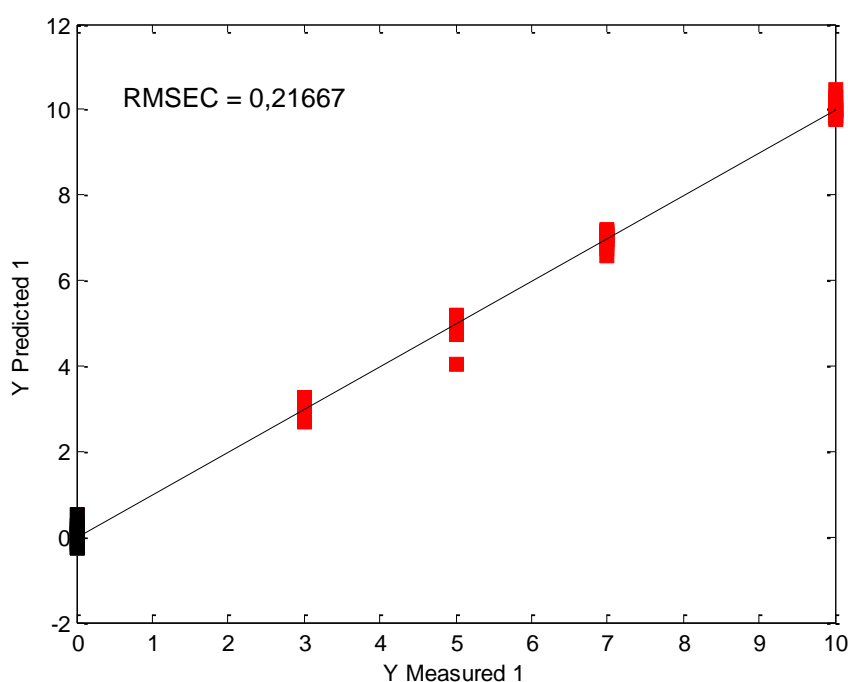


FIGURA 24 – GRÁFICO DOS VALORES MEDIDOS *VERSUS* VALORES PREDITOS PLOTADO PARA VERIFICAR A CAPACIDADE DE PREDIÇÃO DAS PRÓPRIAS AMOSTRAS DO MODELO COM 8 VL EM CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM TE

Por fim, foi construído um conjunto de validação para testar o modelo construído. Este conjunto de validação foi constituído de amostras escolhidas aleatoriamente que não participaram do conjunto de calibração. Portanto, cinco amostras de cada grupo experimental (3, 5, 7 e 10 dias) e 9 amostras do grupo controle foram avaliadas frente ao modelo com 8 VL. A capacidade de previsão do

modelo foi avaliada por meio do valor da raiz quadrada do erro médio de predição (RMSEP), o qual deve também ser um valor baixo, de preferência abaixo de 1. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para os valores preditos pelo modelo, bem como os erros de exatidão. Como pode ser observado, os valores de RMSEP estão dentro do desejado ( $RMSEP < 1,0$ ) quando avaliadas as predições do grupo controle (0 dias) e grupos experimentais (3, 5 e 7 dias). O valor de RMSEP para as amostras após 10 dias ficaram um pouco acima do especificado porém, uma vez que o maior interesse está nos estágios iniciais da doença, as amostras após 10 dias são consideradas um estágio já bastante avançado da doença e, portanto, esse resultado não impediu que o modelo fosse considerado eficiente para prever as amostras desconhecidas do grupo de camundongos Balb-C inoculados com TE. Além disso, mesmo com esta previsão prejudicada não haveria risco de negligenciar a existência da doença (confundindo com controle).

---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****TABELA 3 – AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 29) TESTADO NO MODELO COM 8 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS BALB-C INOCULADOS COM TE**

AMOSTRAS	VALOR REAL	VALOR PREDITO	ERRO	ERRO <sup>2</sup>	RMSEP
CONTROLE	0	0,6175	-0,6175	0,3813	0,2260
	0	0,0750	-0,0750	0,0056	
	0	0,0823	-0,0823	0,0068	
	0	0,0670	-0,0670	0,0045	
	0	0,0502	-0,0502	0,0025	
	0	-0,0713	0,0713	0,0051	
	0	0,0206	-0,0206	0,0004	
	0	0,1559	-0,1559	0,0243	
	0	0,1712	-0,1712	0,0293	
	0	0,1712	-0,1712	0,0293	
CÂNCER	3	2,7758	0,2242	0,0503	0,1769
	3	2,8899	0,1101	0,0121	
	3	3,2023	-0,2023	0,0409	
	3	2,7738	0,2262	0,0512	
	3	2,9555	0,0445	0,0020	
	5	5,1227	-0,1227	0,0151	0,4897
	5	4,5101	0,4899	0,2400	
	5	5,9140	-0,9140	0,8354	
	5	5,3175	-0,3175	0,1008	
	5	5,0874	-0,0874	0,0076	
	7	7,2848	-0,2848	0,0811	0,6195
	7	6,0270	0,9730	0,9467	
	7	6,1174	0,8826	0,7790	
	7	6,6677	0,3323	0,1104	
	7	7,0403	-0,0403	0,0016	
	10	8,5497	1,4503	2,1034	1,3825
	10	9,9012	0,0988	0,0098	
	10	8,6745	1,3255	1,7570	
	10	8,6280	1,3720	1,8824	
	10	8,0495	1,9505	3,8045	

#### 4.3.5 Análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) para os camundongos Swiss inoculados com Tumor de Ehrlich

No presente trabalho, o modelo de predição de estágios de desenvolvimento da doença para os camundongos Swiss inoculados com TE também foi avaliado. Para a construção do conjunto de calibração, a matriz X utilizada foi composta por 13 amostras de cada grupo (controle, 3, 5, 7 e 10 dias;  $n = 65$ ), cada amostra com seus respectivos valores de intensidade máxima (%) para cada valor de  $m/z$  adquirida. O vetor y foi disposto de maneira que as amostras controle receberam o valor 0 (zero), as amostras de 3 dias receberam o valor 3, as amostras de 5 dias o valor 5, as amostras de 7 dias o valor 7 e as amostras de 10 dias o valor 10. O conjunto de calibração foi analisado através do pré-processamento autoescalado para a matriz X e para o vetor y, regressão NIPLS e validação cruzada *Venetian blinds*.

Para compor o conjunto de calibração, 5 VL foram escolhidas por apresentarem os menores erros de validação cruzada quando avaliado o gráfico de RMSECV *versus* número de VL. Este conjunto de calibração foi capaz de explicar aproximadamente 79% da variância acumulada da matriz X e 98% da variância do vetor y (Figura 25).

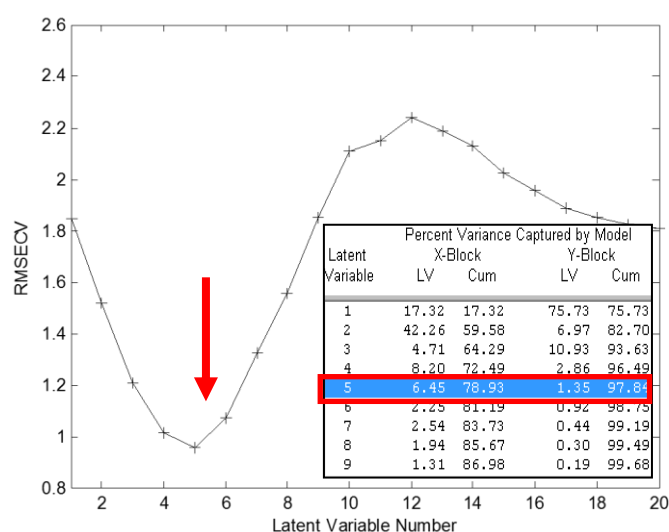


FIGURA 25 – GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM TE

Duas amostras anômalas foram encontradas quando avaliado o gráfico de resíduos de *Students* versus valores de *leverage* ( $L > 0,23$ ), as quais não foram retiradas do conjunto de calibração (Figura 26).

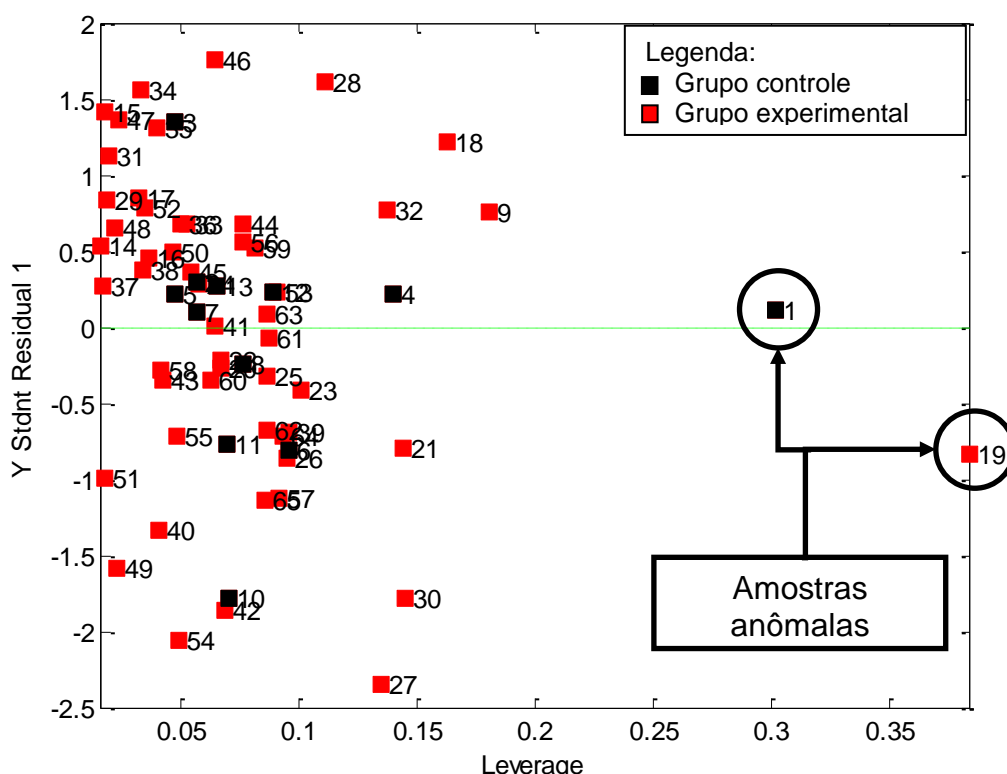


FIGURA 26 – GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS DE *STUDENTS* PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 5 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM TE

A capacidade de predição do modelo em relação as suas próprias amostras demonstraram um bom resultado, visto que o valor de RMSEC avaliado foi de 0,50073. Por fim, amostras dos grupos experimentais e controle que não participaram do conjunto de calibração (conjunto de validação;  $n = 27$ ) foram testadas no modelo com 5 VL e os valores de erros de predição avaliados por meio do valor obtido para RMSEP. A Tabela 4 mostra que os valores preditos estão muito próximos dos valores reais, levando a conclusão de que o modelo com 5 VL para a linhagem Swiss também foi considerado um bom modelo para classificar as amostras em relação ao estágio de desenvolvimento da doença.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 4 – AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 27) TESTADO NO MODELO COM 5 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM TE

AMOSTRAS	VALOR REAL	VALOR PREDITO	ERRO	ERRO <sup>2</sup>	RMSEP
CONTROLE	0	0,4954	-0,4954	0,2454	0,4481
	0	0,4068	-0,4068	0,1655	
	0	0,5597	-0,5597	0,3133	
	0	-0,5742	0,5742	0,3297	
	0	-0,4051	0,4051	0,1641	
	0	0,3541	-0,3541	0,1254	
	0	0,2491	-0,2491	0,0621	
CÂNCER	3	2,4393	0,5607	0,3144	0,4780
	3	2,5842	0,4158	0,1729	
	3	2,2895	0,7105	0,5048	
	3	2,6599	0,3401	0,1157	
	3	3,1865	-0,1865	0,0348	
	5	5,6555	-0,6555	0,4297	0,5642
	5	4,4453	0,5547	0,3077	
	5	4,0915	0,9085	0,8254	
	5	5,1288	-0,1288	0,0166	
	5	4,8882	0,1118	0,0125	
	7	7,1048	-0,1048	0,0110	0,5584
	7	7,3293	-0,3293	0,1084	
	7	7,1704	-0,1704	0,0290	
	7	6,8336	0,1664	0,0277	
	7	5,8239	1,1761	1,3832	
	10	10,3689	-0,3689	0,1361	0,3139
	10	9,4544	0,5456	0,2977	
	10	9,9033	0,0967	0,0094	
	10	10,1508	-0,1508	0,0227	
	10	9,8358	0,1642	0,0270	

#### 4.4 DIAGNÓSTICO DO SARCOMA 180 EM CAMUNDONGOS SWISS UTILIZANDO DIMS-PCA

Uma vez que o método de DIMS-PCA apresentou eficiência na distinção entre os grupos com e sem câncer, com a detecção precoce de um tipo de neoplasia experimental (TE) e ainda, que estes resultados puderam ser observados tanto na linhagem isogênica quanto na linhagem selvagem, a idéia seguinte foi avaliar o método também frente a outro tipo de neoplasia. Neste caso, foram utilizadas células de Sarcoma 180 (S180) inoculadas em camundongos da linhagem Swiss em virtude da facilidade de obtenção destes animais frente a linhagem Balb-C.

Para a condução dos experimentos, camundongos Swiss receberam injeções i.p. de uma suspensão de células tumorais de S180 e os animais tiveram o sangue coletado nos tempos de 0, 3, 5, 7 e 10 dias após a inoculação do S180. As análises do soro sanguíneo dos grupos controle (0 dias) e experimentais (3, 5, 7 e 10 dias) foram conduzidas por meio da infusão direta no espectrômetro de massas e a viabilidade de um diagnóstico precoce foi avaliada da mesma maneira como nos experimentos com o TE. Análises de componentes principais (PCA) foram realizadas para classificação das amostras e análise de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) para modelagem dos dados e predição de amostras desconhecidas.

Conforme descrito anteriormente, os espectros de massas obtidos tanto para o grupo controle quanto para o grupo experimental foram muito similares e impossíveis de serem distinguidos visualmente e por se tratar de uma quantidade enorme de dados, análises quimiométrias foram necessárias. Desta forma, os dados foram analisados primeiramente por PCA na tentativa de poder diferenciar os grupos experimentais e controle e realizar um diagnóstico precoce do S180 nos camundongos Swiss.

Para compor a matriz X da PCA, os dados provenientes dos espectros de massas do grupo controle e experimentais foram dispostos em uma planilha do software Origin de maneira que cada coluna correspondia a uma amostra de soro sanguíneo de um camundongo enquanto cada linha correspondia à intensidade máxima (%) detectada pelo equipamento para cada valor de  $m/z$  adquirida dentro da faixa analisada (50 a 1800 Da). Em seguida, os dados foram exportados para o

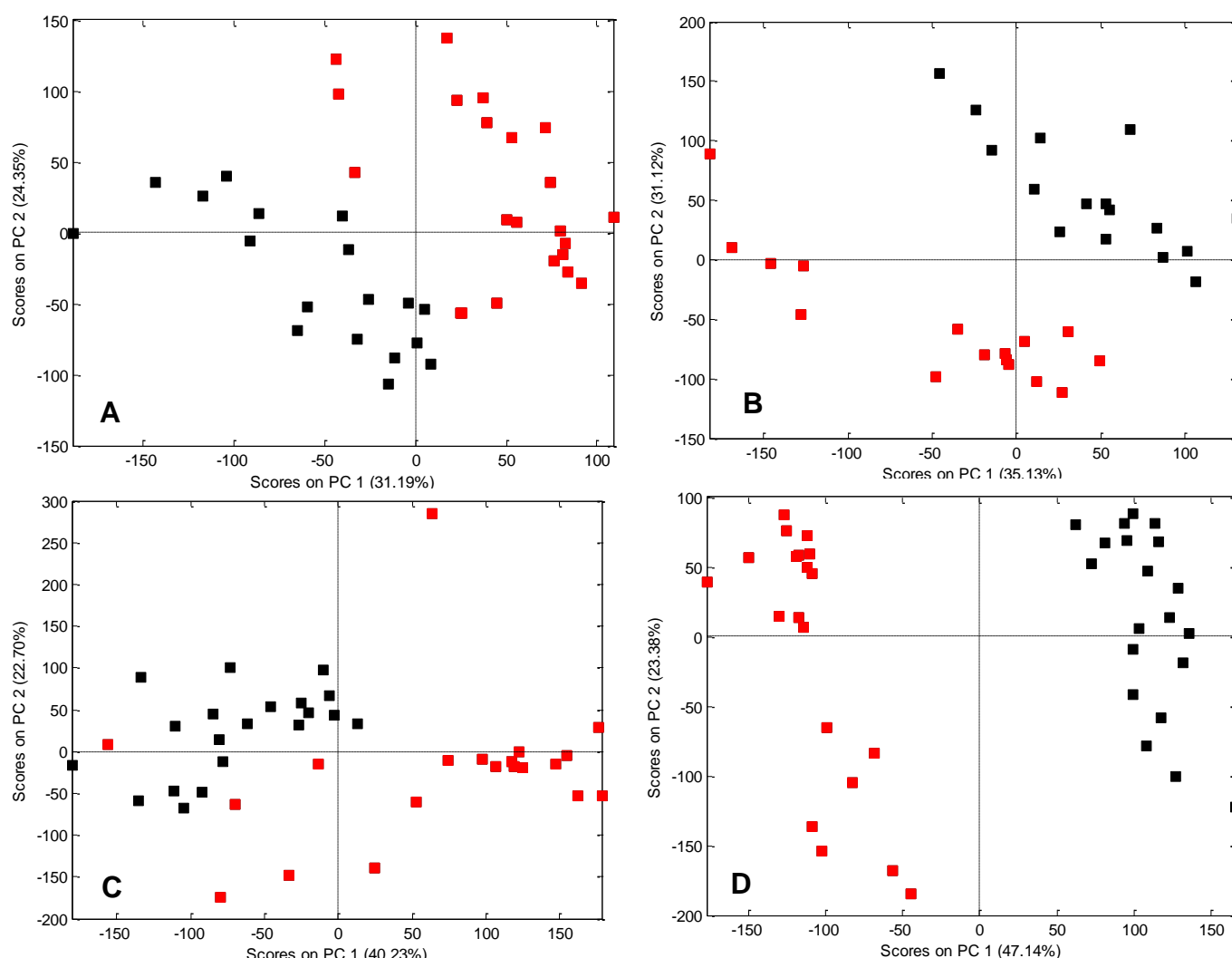
---

software Matlab, as matrizes foram transpostas e o pré-processamento dados centrados na média foi aplicado para a condução das análises de PCA.

A escolha do número de componentes principais (CPs) a serem investigadas para cada dia de análise foi avaliada através do gráfico de *Eigenvalues versus* número de CPs de forma a escolher sempre a CP a partir da qual não existia mais um aumento significativo da variância total explicada. Portanto, para cada PCA realizada nos camundongos Swiss inoculados com S180, um determinado número de componentes principais foi investigado: 6 CPs para as amostras após 3 dias, 4 CPs para as amostras após 5 dias, 5 CPs para amostras após 7 dias e 4 CPs para as amostras após 10 dias, correspondendo a aproximadamente 83%, 80%, 87% e 84% da variância acumulada, respectivamente.

Definido, portanto o número de CPs a ser investigado, o próximo passo foi a construção dos gráficos de scores obtidos a partir dos espectros de massas dos grupos experimental e controle nos diferentes estágios de desenvolvimento do S180 em camundongos Swiss (Figura 27). É possível observar separação entre os grupos após 3, 5 e 7 dias porém, uma precisa separação dos grupos experimental e controle ocorreu apenas após 10 dias da indução do S180 (Figura 27 D). Para esta diferenciação foram necessárias 4 CP's mas a projeção dos dados no espaço bidimensional (CP1 x CP2) foi a que melhor favoreceu a visualização da separação dos grupos. No entanto, apenas uma CP (CP1) foi necessária, a qual representou aproximadamente 47% da variância dos dados espectrais. Em outras palavras, podemos dizer que após o décimo dia da inoculação do S180, as diferenças encontradas entre os grupos experimentais e controle são devidas a presença de sinais que estão em maior intensidade no espectro de massas.

---



**FIGURA 27 – GRÁFICOS DE SCORES DE AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS SWISS OBTIDOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO SARCOMA 180: (A) 3DIAS, (B) 5 DIAS, (C) 7 DIAS E (D) 10 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO S180. DADOS: (■) AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE; (■) AMOSTRAS DO GRUPO EXPERIMENTAL**

Por outro lado, as análises realizadas para 3, 5 e 7 dias após a indução do S180 (Figuras 27A, 27B e 27C, respectivamente), mostraram uma tendência de diferenciação entre os grupos controle e experimental, porém somente com a introdução de uma segunda CP (CP2). Isto implica na existência de importantes argumentos de diferenciação em sinais espectrais de menor intensidade.

De fato, os gráficos de scores após 3 e 7 dias da indução do S180, mostram que a maior parte das amostras contendo câncer estão posicionadas no lado positivo de CP1 (Figuras 27A e 27C), porém com algumas delas passando para o lado negativo. O mesmo é observado para a análise após 5 dias (Figura 27B), porém

a maioria das amostras com câncer estão do lado negativo de CP1 e CP2. Se considerarmos a análise inicial realizada somente com amostras controles e apresentada anteriormente na Figura 14 (pg. 84), algumas variações intrínsecas são comuns e naturais nas análises de PCA, mesmo quando consideradas duplicatas e, portanto, justifica-se a conclusão de que foi sim possível uma diferenciação das amostras após 3 dias da indução do S180, porém com alguns detalhes dos espectros de massas responsáveis por esta diferenciação.

Para caracterizar os íons responsáveis pela diferenciação entre os grupos experimental e controle foram plotados os gráficos de *loadings*, ou seja, o peso com que cada variável contribuiu para a construção das CPs permitindo a separação dos grupos. Portanto, para as amostras após 3, 5 e 7 dias da indução do S180, foram plotados os *loadings* de CP1 e CP2, enquanto para as amostras após 10 dias foram plotados os *loadings* de CP1 apenas (Figura 28).

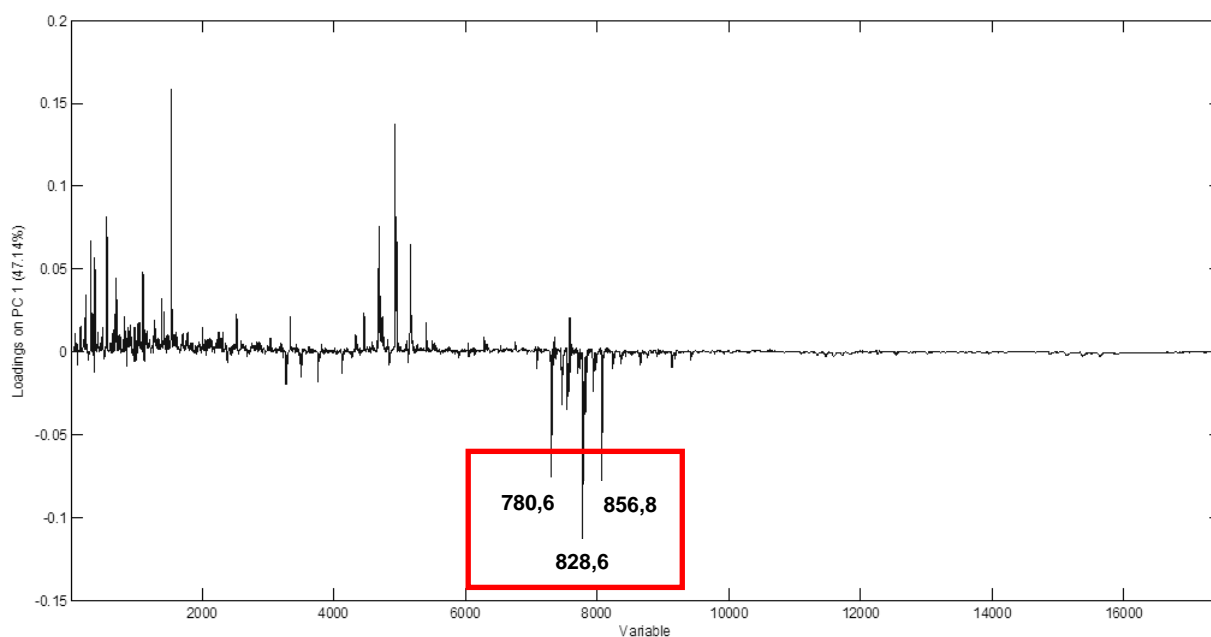


FIGURA 28 – GRÁFICO DE *LOADINGS* DE CP1 OBTIDO PARA AS AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS 10 DIAS DA INDUÇÃO DO S180

Conforme observado na Figura 28, os íons de  $m/z$  780,6; 828,6 e 856,8 foram aqueles que se destacaram e permitiram a diferenciação entre o grupo experimental após 10 dias da indução do S180 e o grupo controle.

A análise dos gráficos de *loadings* de CP1 e CP2 para as amostras após 3 dias da indução do S180 está mostrada na Figura 29. Lembrando que quando foram analisados os gráficos de *scores* a maioria das amostras do grupo experimental estava posicionada no lado positivo de CP1 logo, quando plotado o gráfico de *loadings* de CP1 foram encontrados no lado positivo desta componente os íons de  $m/z$  518,5; 758,6; 780,6; 804,6; 808,8; 828,6 e 832,6 como íons de maior relevância (Figura 29A). No entanto, quando avaliado o gráfico de *loadings* de CP2 não foram evidenciadas muitas diferenças, somente a diminuição da intensidade dos sinais referente aos íons de  $m/z$  804,6; 808,8; 828,6 e 832,6 (Figura 29B).

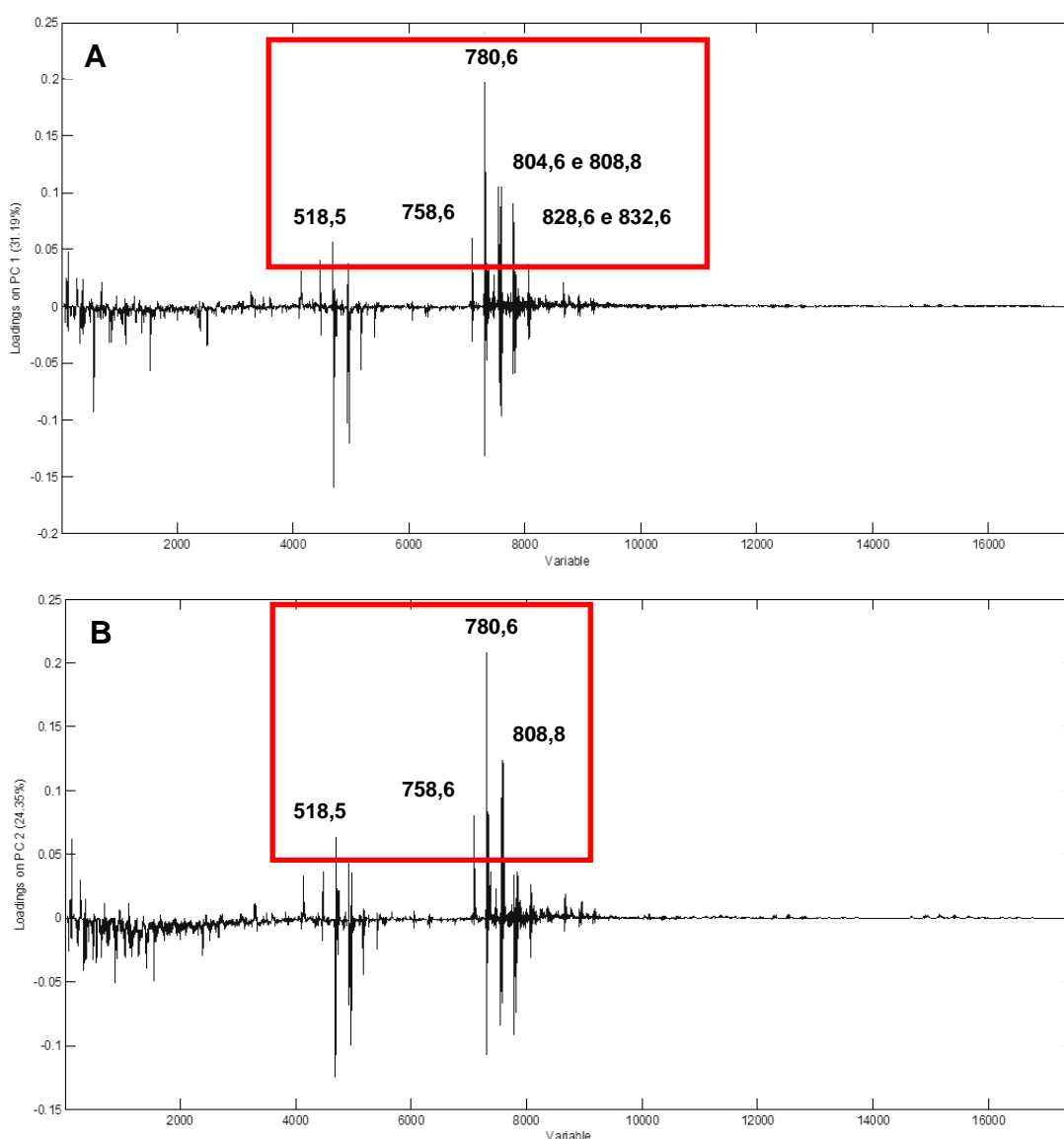


FIGURA 29 – GRÁFICO DE *LOADINGS* OBTIDO PARA AS AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS 3 DIAS DA INDUÇÃO DO S180. (A) *LOADINGS* DE CP1 E (B) *LOADINGS* DE CP2

A análise dos gráficos de *loadings* de CP1 e CP2 para as amostras após 5 e 7 dias da indução do S180 também foram realizadas de forma similar à anterior mostrada. Os íons apontados como de maior relevância nestas análises estão listados na Tabela 5.

TABELA 5 – ÍONS DE MAIOR RELEVÂNCIA INDICADOS NAS ANÁLISES DOS GRÁFICOS DE *LOADINGS* OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS 5 E 7 DIAS DA INDUÇÃO DO S180

CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S-180			
APÓS 5 DIAS		APÓS 7 DIAS	
(-) <sup>*</sup> CP1	(-) <sup>*</sup> CP2	(+) <sup>**</sup> CP1	(-) <sup>*</sup> CP2
518,5	780,6	518,5	518,5
542,6	808,8	546,5	546,5
546,5	828,6	780,6	780,6
780,6	-	804,6	808,8
808,8	-	828,6	828,6
-	-	832,6	856,8
-	-	856,8	-

\*(-): lado negativo da CP

\*\* (+): lado positivo da CP

Pode-se observar que os íons de maior relevância que apareceram na análise dos camundongos Swiss inoculados com S180 foram semelhantes aos íons apontados nas análises dos camundongos Swiss e Balb-C inoculados com TE. Portanto, mais uma vez ficou demonstrada a presença de íons compreendidos na faixa entre *m/z* 500 to 850 Da, geralmente relacionados a classe dos fosfolipídios (JIA *et al.*, 2006; LOKHOV *et al.*, 2010). A identificação destes íons será abordada posteriormente no item 4.5.

Como consideração final da análise realizada para os camundongos Swiss inoculados com S180, é possível afirmar que o método de DIMS-PCA permitiu classificar amostras controle e com câncer quando avaliado este tipo de neoplasia. Uma vez que o tempo de sobrevivência dos camundongos Swiss inoculados com S180 foi de  $20,0 \pm 2$  dias, um resultado após 3 dias correspondeu a 1/6 (um sexto) do

tempo de sobrevida médio dos camundongos, um diagnóstico considerado também bastante precoce.

Quando comparados os resultados obtidos neste estudo com os resultados de Silva e colaboradores (2010) foi possível demonstrar mais uma vez a grande sensibilidade do método de DIMS-PCA, uma vez que os pesquisadores não conseguiram classificar os grupos experimentais e controle antes de 10 dias da indução do S180, utilizando a ferramenta de ressonância magnética nuclear (RMN) (SILVA, 2010).

Finalmente, a próxima etapa foi modelar os dados obtidos para os dados obtidos para tentar prever novas amostras quanto ao estágio de desenvolvimento da doença.

#### 4.4.1 Análise dos mínimos quadrados parciais (PLS) para os camundongos Swiss inoculados com S180

O conjunto de calibração foi construído da seguinte forma: a matriz  $X$  ( $n = 65$ ) foi composta de 13 amostras de cada grupo (controle, 3, 5, 7 e 10 dias após indução do S180), cada amostra com seus respectivos valores de intensidade máxima (%) para cada valor de  $m/z$  adquirida. O vetor  $y$  foi disposto de maneira que as amostras controle receberam o valor 0 (zero), as amostras de 3 dias receberam o valor 3, as amostras de 5 dias o valor 5 e assim sucessivamente. O conjunto de calibração foi analisado através do pré-processamento autoescalado tanto para a matriz  $X$  quanto para o vetor  $y$ , regressão NIPLS e validação cruzada *Venetian blinds*.

Para verificar quantas variáveis latentes (VL) foram necessárias para compor o conjunto de calibração, o gráfico da raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (RMSECV) *versus* número de VL foi plotado (Figura 30). Foram escolhidas 4 VL para compor o conjunto de calibração as quais demonstraram baixos erros de validação cruzada e além disso, foram capazes de explicar cerca de 63% da variância acumulada da matriz  $X$  e 97% da variância acumulada do vetor  $y$ .

---



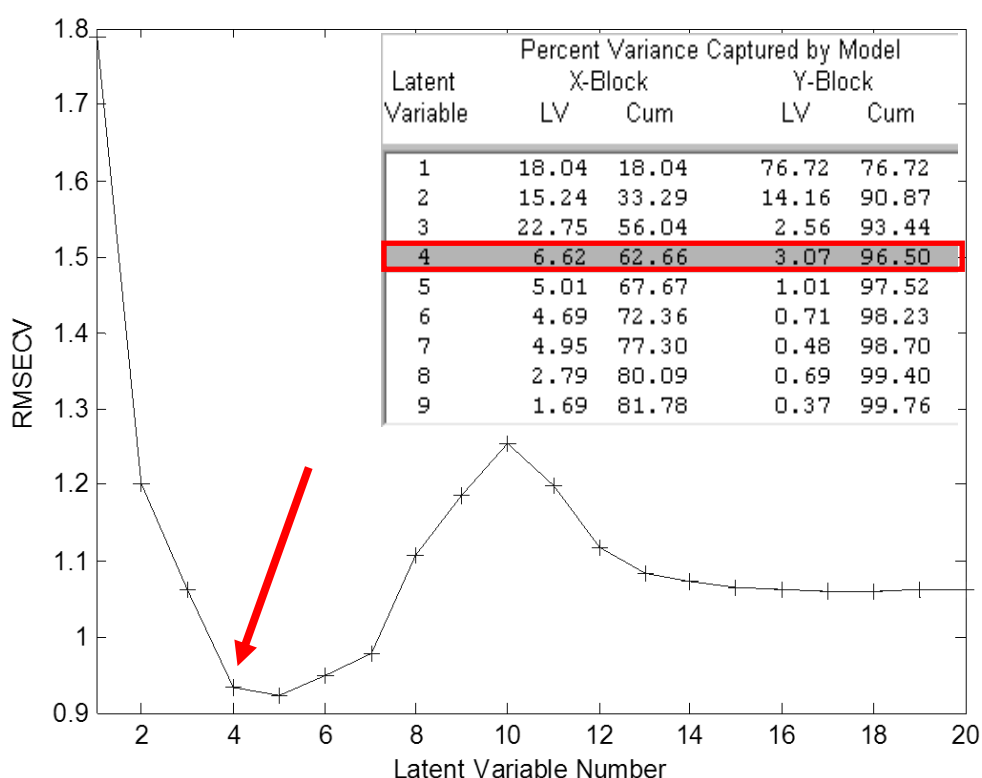


FIGURA 30 – GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180

Escolhido o número de VL, o próximo passo foi a verificação da presença de amostras anômalas. Mais uma vez, o gráfico de *leverage versus* resíduos de Students foi plotado e uma amostra foi considerada anômala em *leverage* (amostra nº 41), uma vez que ela ficou acima do valor de *leverage* calculado ( $L = 3 \times VL/n = 3 \times 4/65 = 0,185$ ); enquanto outra amostra mostrou-se anômala por resíduos de Students ( $R > 2,5$ ) (amostra nº 44) (Figura 31).

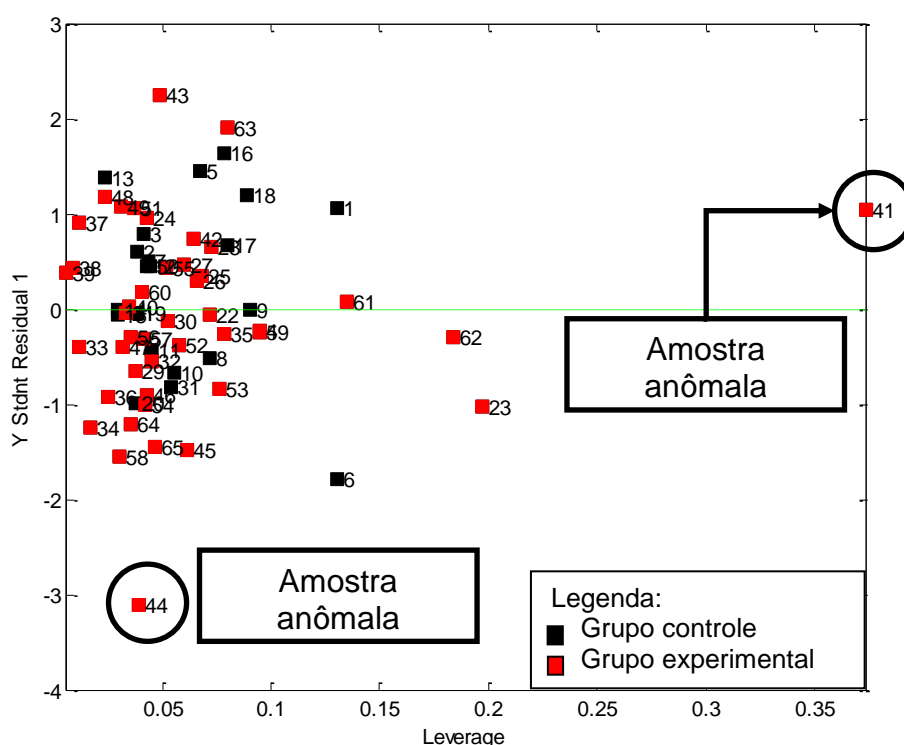


FIGURA 31 – GRÁFICO DE *LEVERAGE* VERSUS RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 4 VL PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180

Sendo assim, conforme explicado anteriormente, os valores de *leverage* indicam se uma amostra é ou não diferente das demais, mas é necessária uma análise conjunta com os resíduos, para afirmar se esta amostra corresponde realmente a uma anomalia. Já os resíduos de *Students* correspondem a desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo sendo que a presença de valores altos de resíduos significa que o modelo não está conseguindo modelar os dados de forma adequada. Portanto, amostras com altos resíduos e pequenos valores de leverage provavelmente apresentam algum erro no valor mensurado que deve de preferência ser medido novamente ou então esta amostra é simplesmente excluída. Amostras com altos resíduos e altos valores de *leverages* correspondem certamente à amostras anômalas e devem ser retiradas do modelo de calibração (BARTHUS; MAZO; POPPI, 2005). Sendo assim, foram construídos dois modelos de predição: o primeiro no qual as amostras anômalas (41 e 44) permaneceram (Modelo 1: com 4 VL) e o outro descartando as amostras anômalas (Modelo 2: também com 4 VL).

O Modelo 1 portanto, constou do conjunto de validação contendo as 4VL mostradas anteriormente na Figura 30 e permanecendo as amostras anômalas indicadas na Figura 31. Em seguida foi avaliado o valor de RMSEC, ou seja, a capacidade de predição das próprias amostras do Modelo 1 apresentou valor compatível com o desejado, ou seja, menor que 1 (RMSEC = 0,6368) enquanto a capacidade de predição do modelo testado em um conjunto de validação (n = 35) foi avaliada por meio dos valores de RMSEP (Tabela 6).

TABELA 6 – AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 35) TESTADO NO MODELO 1 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180

AMOSTRAS	VALOR REAL	VALOR PREDITO	ERRO	ERRO <sup>2</sup>	RMSEP
CONTROLE	0	-0,2058	0,2058	0,0424	0,7217
	0	0,3526	-0,3526	0,1243	
	0	0,8370	-0,8370	0,7005	
	0	0,5720	-0,5720	0,3272	
	0	1,5434	-1,5434	2,3821	
	0	-0,2525	0,2525	0,0637	
	0	0,0771	-0,0771	0,0059	
CÂNCER	3	3,2304	-0,2304	0,0531	0,6377
	3	3,9780	-0,9780	0,9565	
	3	3,4742	-0,4742	0,2249	
	3	2,4850	0,5150	0,2652	
	3	2,8284	0,1716	0,0294	
	3	3,9390	-0,9390	0,8817	
	3	2,3401	0,6599	0,4355	
	5	5,0602	-0,0602	0,0036	0,4969
	5	4,2809	0,7191	0,5171	
	5	5,1017	-0,1017	0,0103	
	5	4,8380	0,1620	0,0262	
	5	4,5000	0,5000	0,2500	
	5	4,0658	0,9342	0,8727	
	5	5,2208	-0,2208	0,0488	

TABELA 6 CONTINUAÇÃO – AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 35) TESTADO NO MODELO 1 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180

	VALOR REAL	VALOR PREDITO	ERRO	ERRO <sup>2</sup>	RMSEP
CÂNCER	7	7,2448	-0,2448	0,0599	0,6819
	7	7,8518	-0,8518	0,7256	
	7	7,0584	-0,0584	0,0034	
	7	6,4010	0,5990	0,3588	
	7	7,3595	-0,3595	0,1292	
	7	7,9026	-0,9026	0,8147	
	7	8,0789	-1,0789	1,1640	
	10	10,1170	-0,1170	0,0137	0,9714
	10	9,5529	0,4471	0,1999	
	10	9,1702	0,8298	0,6886	
	10	8,2828	1,7172	2,9488	
	10	9,7905	0,2095	0,0439	
	10	9,0489	0,9511	0,9046	
	10	8,6561	1,3439	1,8061	

Para a construção do Modelo 2 foram retiradas do conjunto de calibração as amostras considerada anômalas (n° 44 e n°41). O novo conjunto de calibração (n = 63) mostrou baixos erros de validação cruzada quando utilizadas 4 VL, as quais puderam explicar grande parte da variância acumulada da matriz X e do vetor y (cerca de 62% e 97%, respectivamente) (Figura 32).

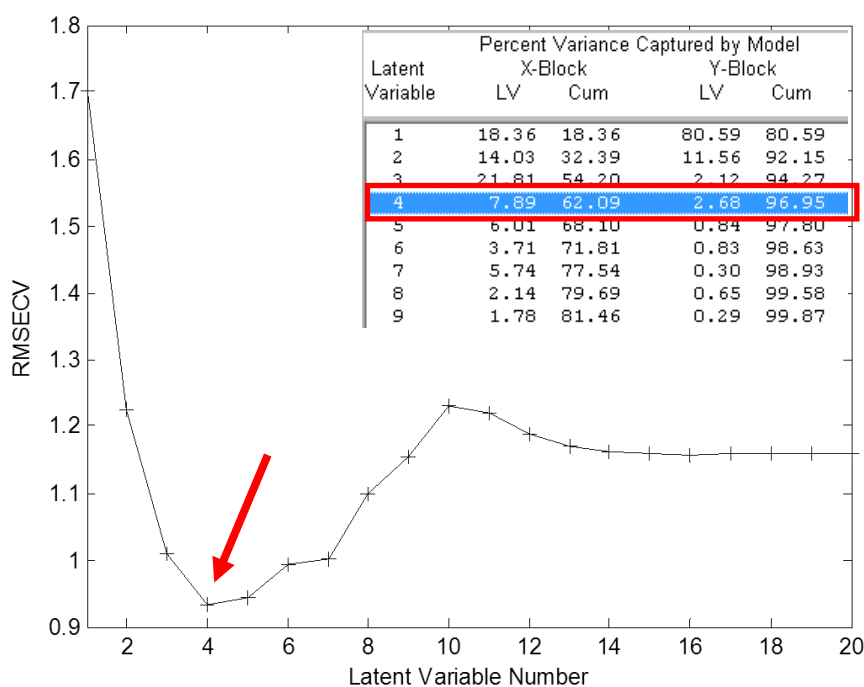


FIGURA 32 – GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180. MODELO SEM AMOSTRAS ANÔMALAS 41 E 44

No entanto, o gráfico de valores de *leverage versus* resíduos de *Students* detectou novas amostras anômalas em *leverage*: a amostra 23 e a amostra 60 ( $L > 0,19$ ) (Figura 33).

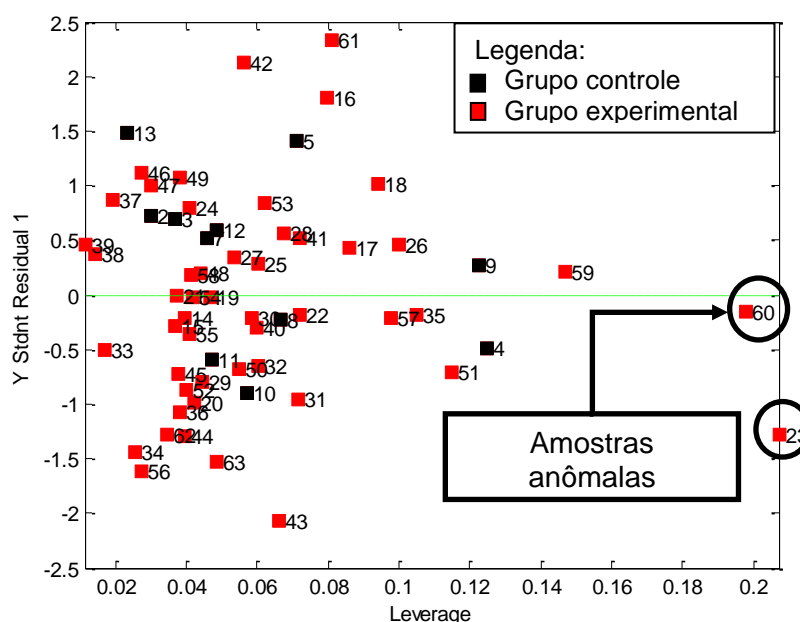


FIGURA 33 – GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 4 VL OBTIDO APÓS REMOÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS 41 E 44 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180

Portanto, as amostras 23 e 60 foram retiradas do conjunto de calibração ficando o novo conjunto com 61 amostras. Novamente, foram necessárias 4 VL's para explicar grande parte dos dados com pequenos erros de validação cruzada (60% da matriz X e 97% do vetor y) (Figura 34). Em seguida, quando avaliado se outras amostras anômalas estavam presentes, constatou-se somente a amostra 59 com o valor de *leverage* acima do calculado ( $L > 0,19$ ), porém ela foi mantida no conjunto de calibração (Figura 35).

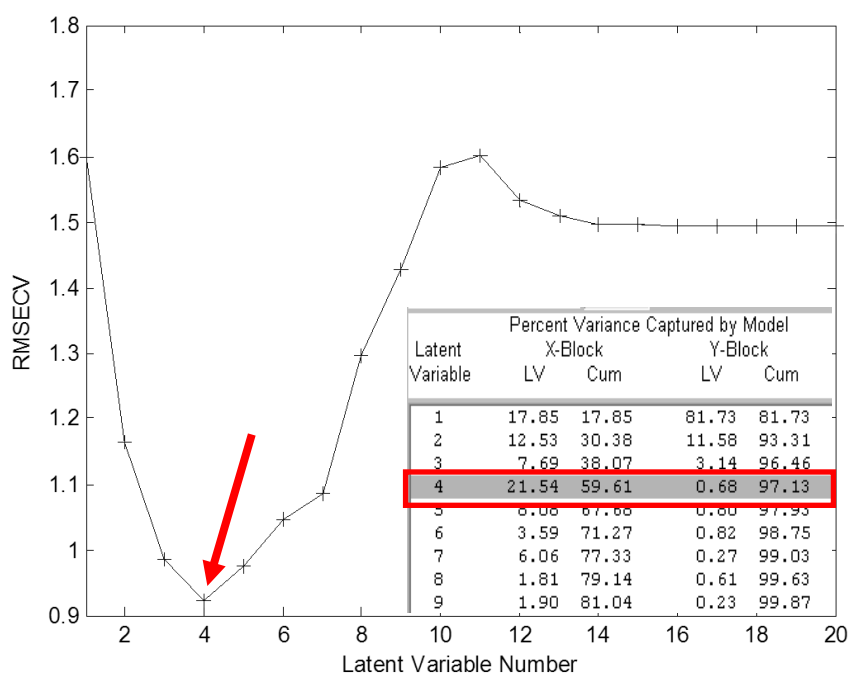


FIGURA 34 – GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VL, PLOTADO PARA A ESCOLHA DO NÚMERO DE VL A SEREM UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180. MODELO SEM AMOSTRAS ANÔMALAS 41, 44, 23 E 60

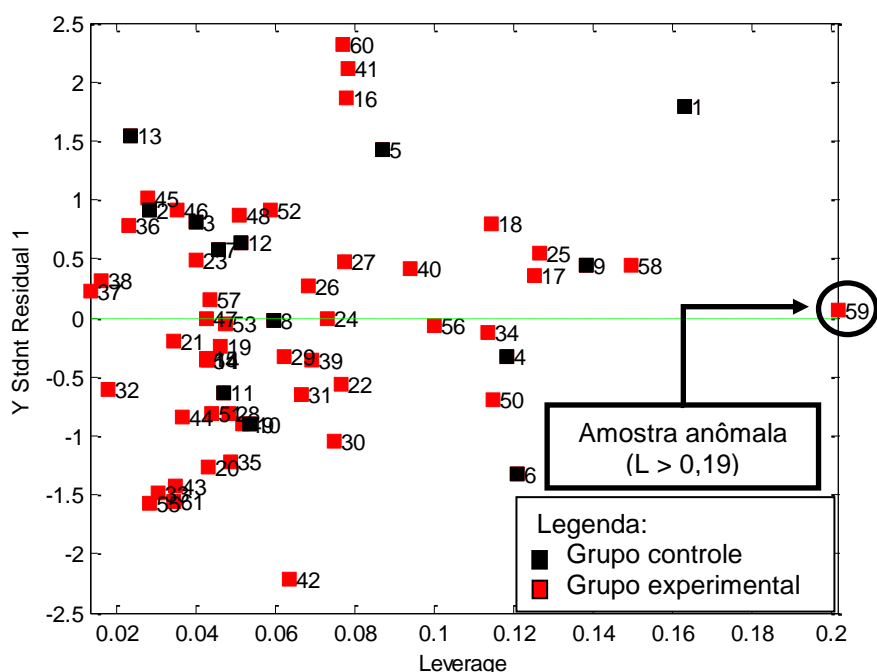


FIGURA 35 – GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS DE STUDENTS PLOTADO PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO COM 4 VL OBTIDO APÓS REMOÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS 23 E 60 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180

Sendo assim, o modelo foi testado frente as próprias amostras e, a partir do gráfico de valores medidos *versus* valores preditos, foi possível dizer que o Modelo 2 (n = 61) estava adequado para poder ser utilizado para prever novas amostras (RMSEC = 0,58038). Quando um conjunto de validação (n = 33) foi testado no Modelo 2, algumas das amostras obtidas após 7 e 10 dias da inoculação do S180 em camundongos Swiss apresentaram valor preditos com erros maiores que aqueles encontrados no Modelo 1 e, ainda, o valor de RMSEP não ficou conforme o desejado. Apesar deste resultado, isso não negligenciaria a presença da doença (Tabela 7).

TABELA 7 – AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 35) TESTADO NO MODELO 2 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180

AMOSTRAS	VALOR REAL	VALOR PREDITO	ERRO	ERRO <sup>2</sup>	RMSEP
SEM CÂNCER	0	-0,0723	0,0723	0,0052	0,7966
	0	0,4707	-0,4707	0,2216	
	0	1,0397	-1,0397	1,0810	
	0	0,7565	-0,7565	0,5723	
	0	1,5935	-1,5935	2,5392	
	0	-0,1512	0,1512	0,0228	
	0	0,0011	-0,0011	0,0000	
CÂNCER	3	2,9615	0,0385	0,0015	0,6337
	3	3,5758	-0,5758	0,3315	
	3	3,1094	-0,1094	0,0120	
	3	2,2463	0,7537	0,5681	
	3	2,5700	0,4300	0,1849	
	3	3,6979	-0,6979	0,4871	
	3	1,8926	1,1074	1,2263	



**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

TABELA 7 CONTINUAÇÃO – AVALIAÇÃO DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (n = 35) TESTADO NO MODELO 2 PARA PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER EM CAMUNDONGOS SWISS INOCULADOS COM S180

AMOSTRAS	VALOR REAL	VALOR PREDITO	ERRO	ERRO <sup>2</sup>	RMSEP
CÂNCER	5	4,5449	0,4551	0,2071	0,7319
	5	3,9935	1,0065	1,0130	
	5	4,8165	0,1835	0,0337	
	5	4,3814	0,6186	0,3827	
	5	4,2550	0,7450	0,5550	
	5	3,7519	1,2481	1,5578	
	5	4,9698	0,0302	0,0009	
	7	6,1697	0,8303	0,6894	1,1852
	7	5,9751	1,0249	1,0504	
	7	6,7145	0,2855	0,0815	
	7	8,2006	-1,2006	1,4414	
	7	7,1746	-0,1746	0,0305	
	7	7,7569	-0,7569	0,5729	
	7	9,4430	-2,4430	5,9682	
	10	9,9782	0,0218	0,0005	1,1162
	10	8,9933	1,0067	1,0134	
	10	8,6186	1,3814	1,9083	
	10	8,3315	1,6685	2,7839	
	10	10,0010	-0,0010	0,0000	
	10	8,7709	1,2291	1,5107	
	10	8,7728	1,2272	1,5060	

Por fim, foi realizada uma comparação entre o Modelo 1 e o Modelo 2 de predição de amostras coletadas de camundongos Swiss inoculados com S180 (Tabela 8).

**TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MODELOS 1 E 2 DE PREDIÇÃO DE ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO S-180 EM CAMUNDONGOS SWISS**

	<b>Modelo</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
Nº amostras usadas no modelo	65	61
Nº amostras usadas para predição	35	35
Nº Variáveis latentes (VL)	4	4
Variância explicada em X (%)	62,66	59,61
Variância explicada em Y (%)	96,50	97,13
RMSEC	0,6388	0,5804
RMSEP	0,6422	0,8725

Primeiramente, é importante dizer que, o princípio das análises quimiométricas é sempre tentar explicar a maior parte da variância dos dados com um número reduzido de VL ou CPs, conforme o caso. Portanto, apesar dos dois modelos construídos terem sido eficientes para predizer novas amostras foi possível perceber que a exclusão das amostras anômalas não melhorou o modelo, pois não diminuiu o número de VL e nem melhorou o valor de RMSEC. Sendo assim, o Modelo 1 (4 VL, n = 65), construído para predizer amostras desconhecidas de camundongos Swiss inoculados com S180, foi considerado melhor que o modelo 2 mesmo na presença de amostras anômalas, as quais não prejudicaram a capacidade de predição do modelo. As 4 VL foram capazes de explicar cerca de 63% da variância da matriz X e além disso, os valores de RMSEC e RMSEP foram melhores quando analisado o Modelo 1.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

No presente trabalho, as análises de DIMS associadas à quimiometria foram capazes de diferenciar os grupos controle e experimental em ambas as linhagens e neoplasias estudadas, com a vantagem de obtenção de um diagnóstico precoce. Além disso, os íons relacionados a esta distinção puderam ser destacados nos gráficos de *loadings*, sugerindo que estes estariam sendo responsáveis pela separação dos grupos, caracterizando, portanto, os possíveis biomarcadores. Conforme mencionado anteriormente, os íons destacados nos gráficos de *loadings*, foram aqueles compreendidos na faixa entre  $m/z$  500 a 850 Da, relacionados à classe dos fosfolipídios, mais especificadamente, lisofosfatidilcolinas (LPC) e fosfatidilcolinas (PC).

As LPC são lipídios biologicamente ativos provenientes das PC, as quais são componentes estruturais de membranas celulares. As LPC possuem propriedades de regulação de vários processos biológicos incluindo a proliferação celular, capacidade de invasão de células tumorais e inflamação. Diferentes lisofosfolipídios podem ser encontrados, tanto no grupo dos lisoglicerofosfolipídios (como ácido lisofosfatídico e LPC) ou no grupo dos lisoesfingolipídios (esfingosilfosforilcolina e esfingosina-1-fosfato). A estrutura das LPC compreende uma cabeça polar (grupo acil) e cadeias graxas (hidrocarbonetos) que diferem em seu tamanho, posição e grau de insaturação. As LPC ocorrem em duas formas: com o grupo de ácidos graxos na posição 1 ou 2 do esqueleto de glicerol, fornecendo os regioisômeros LPC (sn-1) ou LPC (sn-2), respectivamente. Para estudos que envolvem doenças, a posição do grupo acil na LPC é importante, pois estes regioisômeros possuem funções biológicas diferentes (KABAROWSKI *et al.*, 2005). Uma vez que são regioisômeros, eles possuem os mesmos íons produtos e, portanto, a discriminação entre eles é difícil. Uma alternativa para a distinção entre os regioisômeros de LPC é a utilização de análises de espectrometria de massas utilizando como fonte de ionização o ESI e experimentos de dissociação induzida por colisão (CID). A partir disso, no modo positivo de ionização, os íons produtos normalmente observados são os de  $m/z$  104 (colina) e  $m/z$  184 (Figura 36) e a razão encontrada entre as suas intensidades máximas pode ser empregada para identificação dos mesmos (DONG

---

*et al.*, 2010), Íons produtos que aparecem em  $m/z$  147 e  $[M+Na-183]^+$  são mais abundantes após experimentos de CID em moléculas sodiadas.

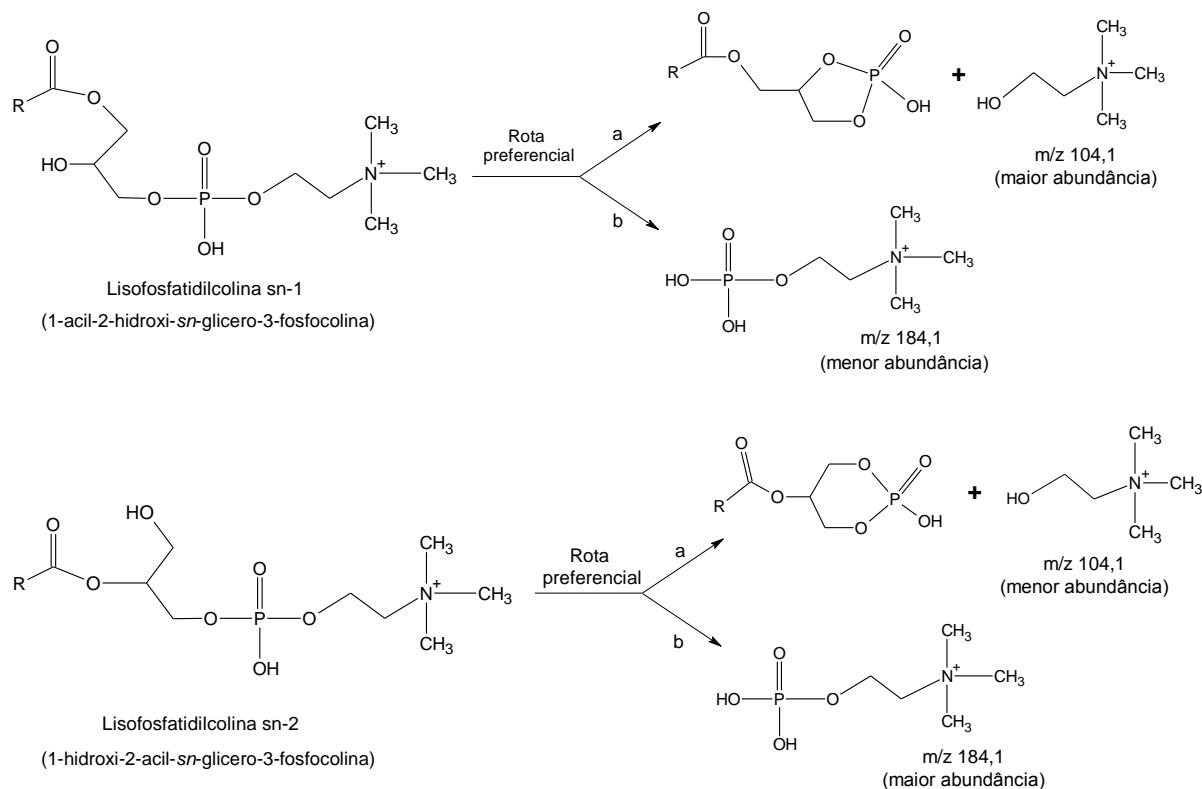


FIGURA 36 – ESTRUTURA DOS REGIOISÔMEROS DE LISOFOSFATIDILCOLINAS (LPC) E PROPOSTA DE DISSOCIAÇÃO DE ALTA ENERGIA INDUZIDA POR COLISÃO NO MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO. FONTE (DONG *et al.*, 2010)

Há muito tempo os pesquisadores vem demonstrando a importância das LPC como biomarcadores em processos patofisiológicos. Um exemplo é o estudo realizado por Okita e colaboradores (1997) o qual demonstrou uma alteração na razão entre LPC 18:2 e LPC 16:0 no plasma de pacientes com câncer de ovário (OKITA *et al.*, 1997). As LPC vem sendo utilizadas como marcadores em estudos metabonômicos de doenças renais e do fígado (YANG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2009).

A concentração de LPC no plasma sanguíneo de pessoas saudáveis normalmente varia entre 200 a 300  $\mu\text{M}$ . Estudos mencionam que as células tumorais consomem mais LPC que as células normais e, portanto, os pacientes com doenças malignas possuem o padrão plasmático de fosfolipídios bastante alterado. Este fato

já foi confirmado em grupos de pacientes com diferentes tipos de neoplasias, os quais tiveram uma diminuição geral de fosfolípidos (TAYLOR *et al.*, 2008). Outro exemplo foi demonstrado em pacientes portadores de leucemia, linfomas malignos e tumores gastrointestinal e renal, cujas concentrações de LPC foram diminuídas quando comparadas aos pacientes saudáveis, mesmo em estágios iniciais das doenças (KULISZKIEWICZJANUS; JANUS; BACZYNSKI, 1996). Resultados similares foram encontrados quando pacientes com neoplasia renal foram comparados com pacientes saudáveis, evidenciando um decréscimo nas concentrações plasmáticas de LPC, em pacientes de ambos os sexos, o qual foi relacionado a estágios do tumor e metástases (SULLENTROP *et al.*, 2002).

A cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) há muito tempo vem sendo empregada para análises de LPC. Este método combina a resolução cromatográfica com a sensibilidade e a rica informação estrutural fornecidas pelos dados de espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial (EM/EM). Enquanto a cromatografia é capaz de separar os regioisômeros de LPC em espécies moleculares individuais, o espectrômetro de massas pode determinar a cadeia acila destes isômeros através da razão obtida entre as intensidades dos íons produtos característicos (HAN; GROSS, 1995; , 1996; ADLERCREUTZ; WEHTJE, 2001).

Sendo assim, no presente trabalho, experimentos de CLAE-EM/EM foram realizados para auxiliar na identificação dos possíveis biomarcadores indicados pelos gráficos de *loadings*. Inicialmente, as amostras foram preparadas, injetadas no CLAE-EM e um experimento de varredura foi obtido (*full scan*).

Considerando que os íons em destaque nas análises de *loadings* foram os de *m/z* 518,5; 542,6; 546,5; 758,7; 780,6; 804,6; 808,8; 828,6; 832,5 e 856,8, procurou-se identificá-los no cromatograma obtido (Figura 37). Sendo assim, os picos observados no cromatograma foram todos investigados com relação aos respectivos espectros de massas fornecidos. A presença dos íons indicados acima foi detectada quando os espectros de massas foram extraídos do cromatograma nos tempos de retenção 9,7; 11,4; 19,5; 23,5 e 51,0 minutos.

---

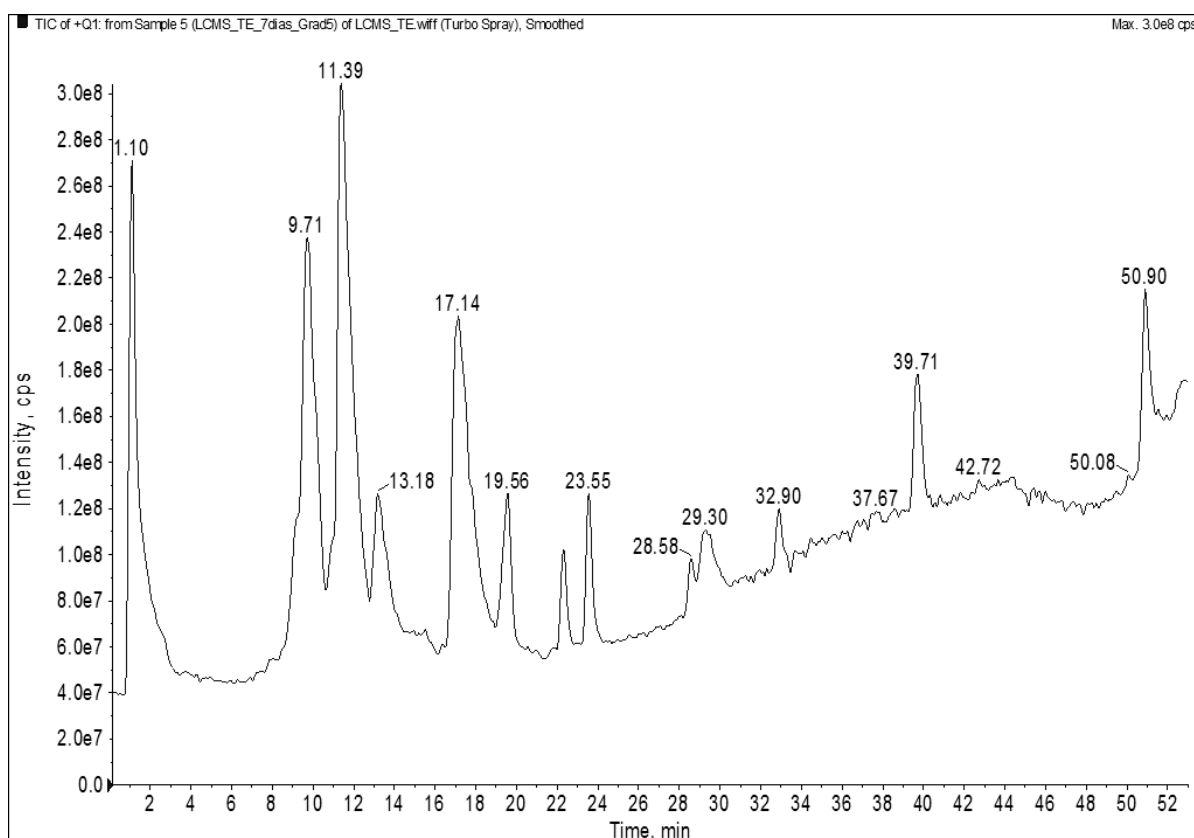


FIGURA 37 – ANÁLISE DE CLAE-EM OBTIDA PARA UMA AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO DE CAMUNDONGO BALB-C APÓS 7 DIAS DA INOCULAÇÃO COM TUMOR DE EHRLICH. CONDIÇÕES DE ANÁLISE DESCRITAS NAS PGS 65-66

A identificação foi realizada através de experimentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) a partir dos íons obtidos tanto nas análises de DIMS quanto nas análises de CLAE-EM e também em função de comparações feitas com dados da literatura (JIA *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2010; LOKHOV *et al.*, 2010).

Analisando e comparando os íons obtidos nas análises de DIMS com os íons extraídos do cromatograma nas análises de CLAE-EM, foi observado que alguns dos íons quasi-moleculares  $[M+H]^+$  extraídos do cromatograma foram correlacionados a íons detectados nos experimentos de DIMS na forma de adutos de sódio  $[M+Na]^+$ . Por exemplo, a Figura 38 mostra os íons extraídos do cromatograma no tempo de retenção em 9,71 minutos.

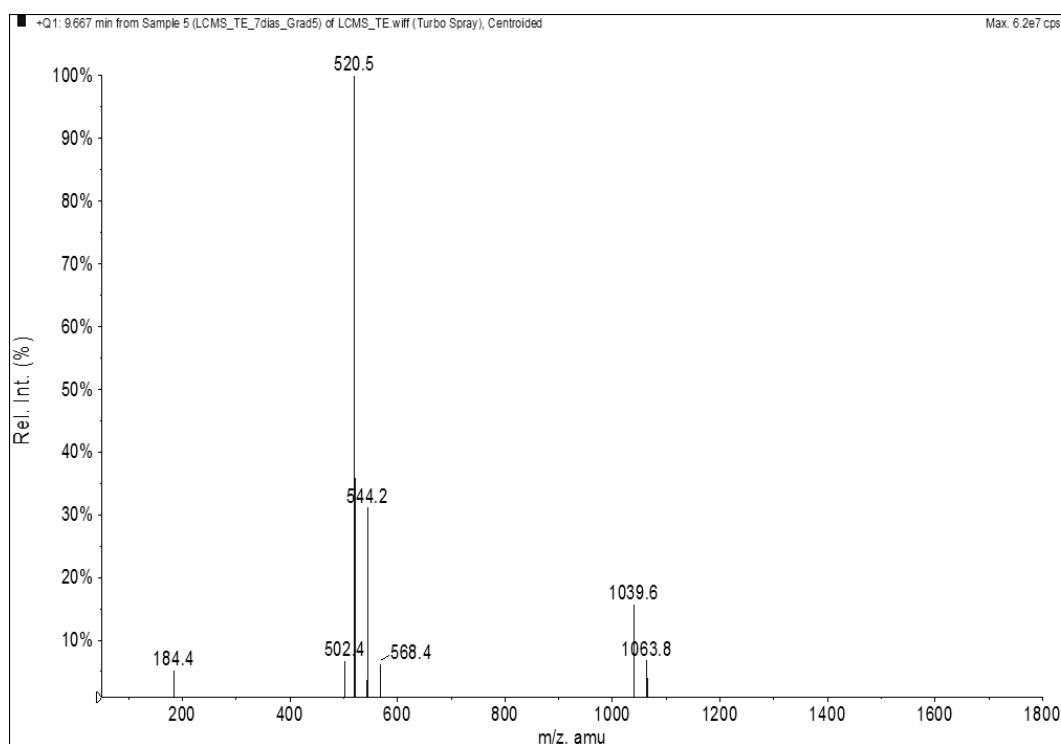


FIGURA 38 – ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 9,71 MINUTOS

Pode-se observar na Figura 38 que os íons que apareceram foram os de  $m/z$  520,5  $[M+H]^+$  e 1039,6  $[2M-H]^+$ . Na análise de DIMS, o íon de  $m/z$  542,6  $[M+Na]^+$  corresponde ao íon de  $m/z$  520,5  $[M+H]^+$  na sua forma adutada com uma molécula de sódio. Esses dados estão em concordância com os encontrados por Lin e colaboradores (2010), que identificaram estes íons como sendo a LPC (18:2(9Z,12Z)) (LIN *et al.*, 2010). A fragmentação específica da cabeça polar das LPC, no modo positivo de ionização, fornece os íons de  $m/z$  104,1 (colina) e 184,1 como íons produtos característicos (LIEBISCH *et al.*, 2002) (DONG *et al.*, 2010). Quando o experimento de CLAE-EM/EM do íon de  $m/z$  520,5  $[M+H]^+$  foi realizado, os íons produtos característicos ( $m/z$  104,1 e 184,1) foram observados confirmando, portanto, a identificação do íon de  $m/z$  520,5  $[M+H]^+$  como sendo a LPC (18:2(9Z,12Z)) (Figura 39). No entanto, quando o experimento de EM/EM foi realizado para o íon de  $m/z$  542,6  $[M+Na]^+$ , foram identificados os íons de  $m/z$  104,1 e  $m/z$  147,0. Estes íons são descritos na literatura como par diagnóstico para íons sodiados de regioisômeros de LPC. Portanto, o íon de  $m/z$  542,6  $[M+Na]^+$  foi identificado também como a LPC (18:2(9Z,12Z)).

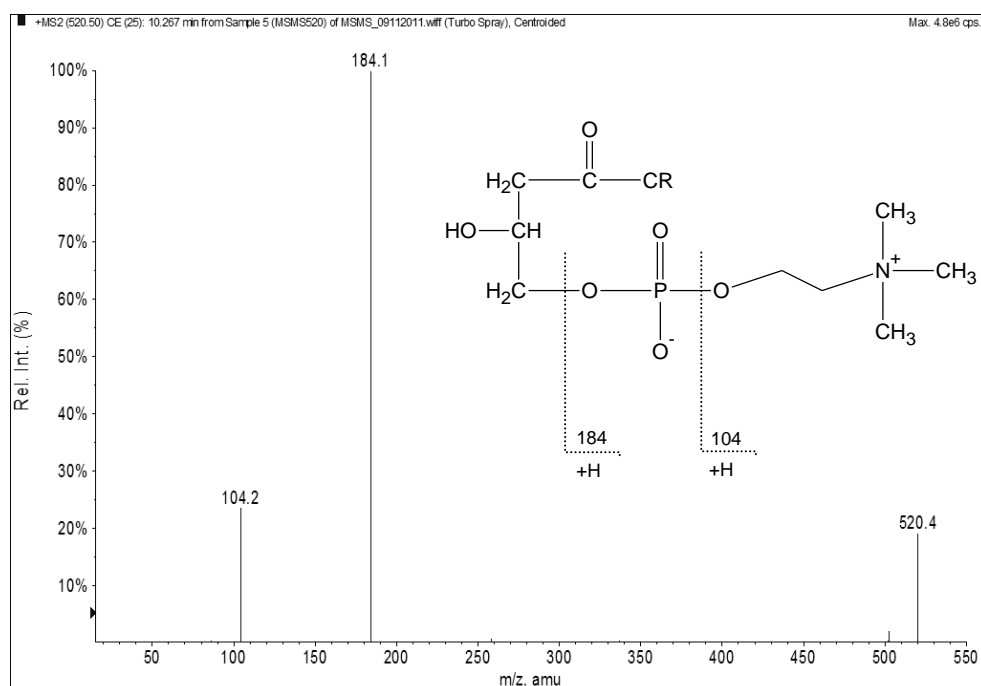


FIGURA 39 – EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE  $m/z$  520,4  $[M+H]^+$  ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM

Quando analisado o espectro de massas extraído no tempo de retenção 11,3 minutos foram encontrados os íons de  $m/z$  496,5  $[M+H]^+$  e  $m/z$  991,5  $[2M-H]^+$  (Figura 40).

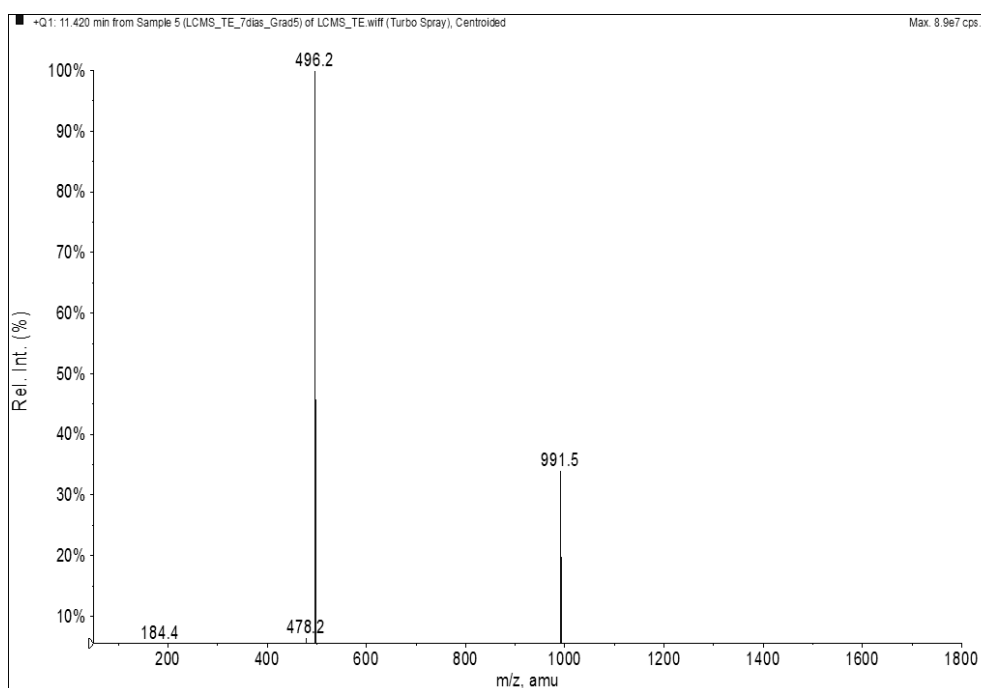


FIGURA 40 – ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 11,4 MINUTOS



Na análise de DIMS, o íon de  $m/z$  518,5  $[M+Na]^+$  corresponde ao íon de  $m/z$  496,5  $[M+H]^+$  adutado com sódio. Estes íons foram previamente identificados como LPC (16:0) (LIN *et al.*, 2010). Para confirmar esta identificação, foram realizados experimentos de CLAE-EM/EM e EM/EM (infusão direta) para os íons de  $m/z$  496,5  $[M+H]^+$  e  $m/z$  518,5  $[M+Na]^+$ , respectivamente. Para o íon de  $m/z$  496,5  $[M+H]^+$  foram encontrados os íons produtos característicos de  $m/z$  86,  $m/z$  104,1 e  $m/z$  184,1 enquanto para o íon de  $m/z$  518,5  $[M+Na]^+$  foram observados os íons de  $m/z$  104,1 e  $m/z$  147,0 confirmando a identificação dos íons de  $m/z$  518,5  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  496,5  $[M+H]^+$  como LPC (16:0) (Figuras 41 e 42).

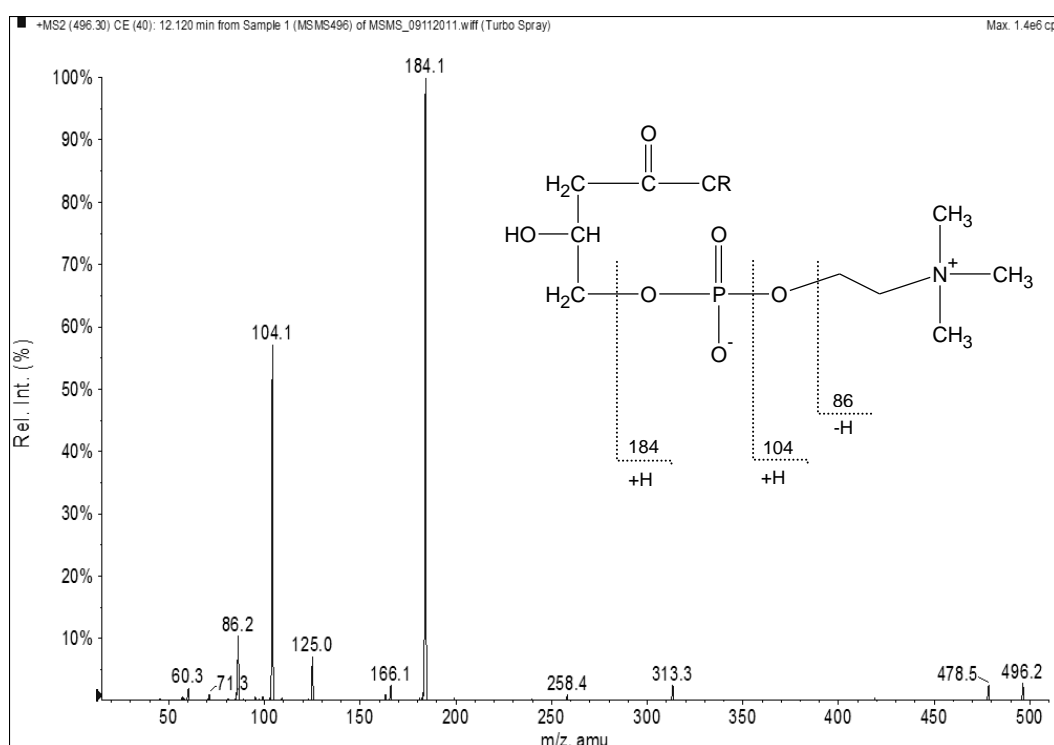


FIGURA 41 – EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE  $m/z$  496,2  $[M+H]^+$  ATRAVES DE CLAE-EM/EM

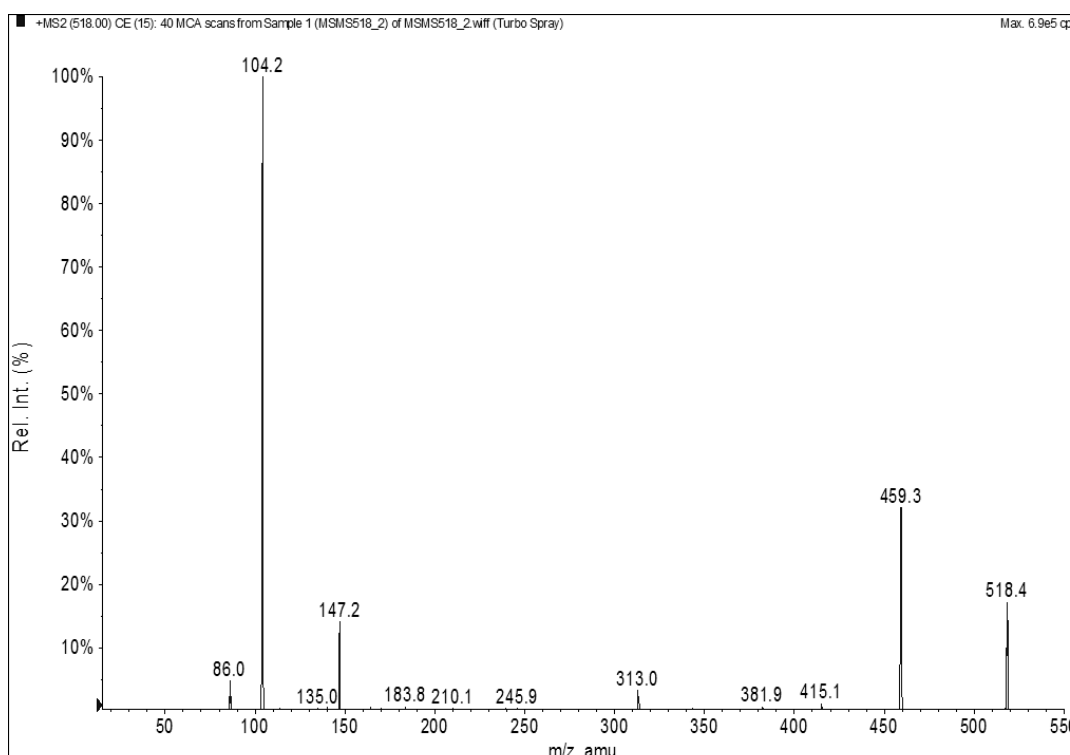


FIGURA 42 – EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE  $m/z$  518  $[M+Na]^+$  ATRAVES DE EM/EM (INFUSÃO DIRETA)

Nos tempos de retenção de 13,2 e 17,1 minutos, foram extraídos os íons de  $m/z$  522,4  $[M+H]^+$  e 524,3  $[M+H]^+$ , respectivamente. Uma vez que o íon de  $m/z$  522,4  $[M+H]^+$  não foi relevante quando analisados os gráficos de *loadings* o experimento de CLAE-EM/EM para este íon não foi realizado. Porém, a literatura identifica este íon como LPC (18:1) (LIN *et al.*, 2010). No entanto, o gráfico de *loadings* apontou o íon de  $m/z$  546,6  $[M+Na]^+$ , o qual pôde ser identificado como sendo o íon de  $m/z$  524,3  $[M+H]^+$  adutado com uma molécula de sódio. Para confirmar esta identificação, foi realizado o experimento de EM/EM do íon de  $m/z$  546,6  $[M+Na]^+$ , sendo encontrados os íons produtos característicos de molécula sodiada (Figura 43). Portanto, este íon foi identificado como sendo a LPC (18:0), em concordância também com dados da literatura (LIN *et al.*, 2010).

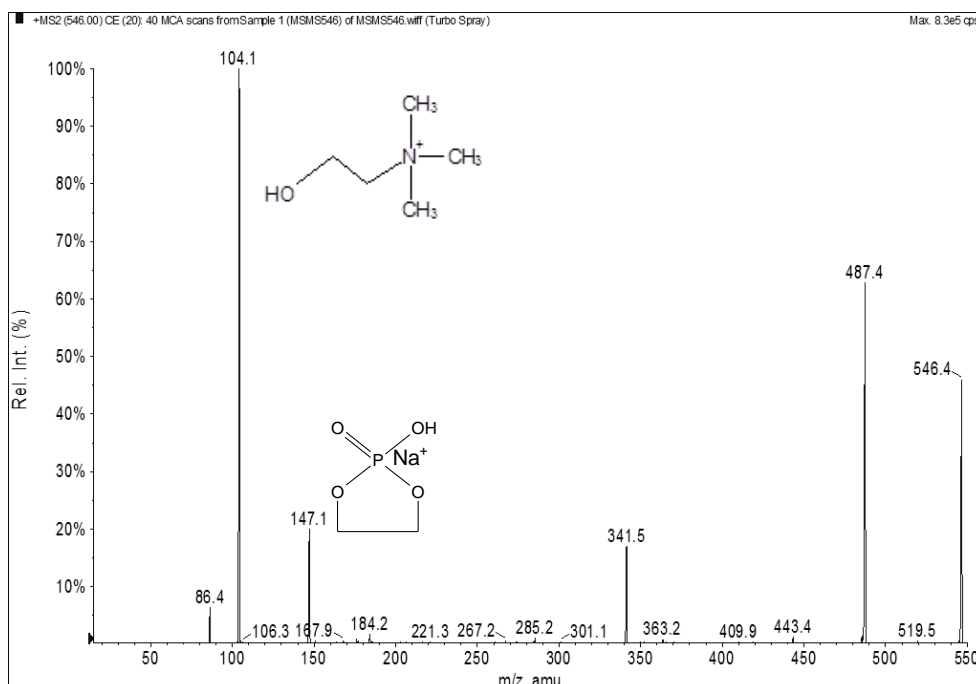


FIGURA 43 – EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE  $m/z$  546,4  $[M+Na]^+$  ATRAVÉS DE EM/EM (INFUSÃO DIRETA)

Os íons extraídos do cromatograma no tempo de retenção em 19,5 minutos foram os de  $m/z$  546,2  $[M+H]^+$ , 804,5  $[M+H]^+$  e 808,8  $[M+H]^+$  (Figura 44).

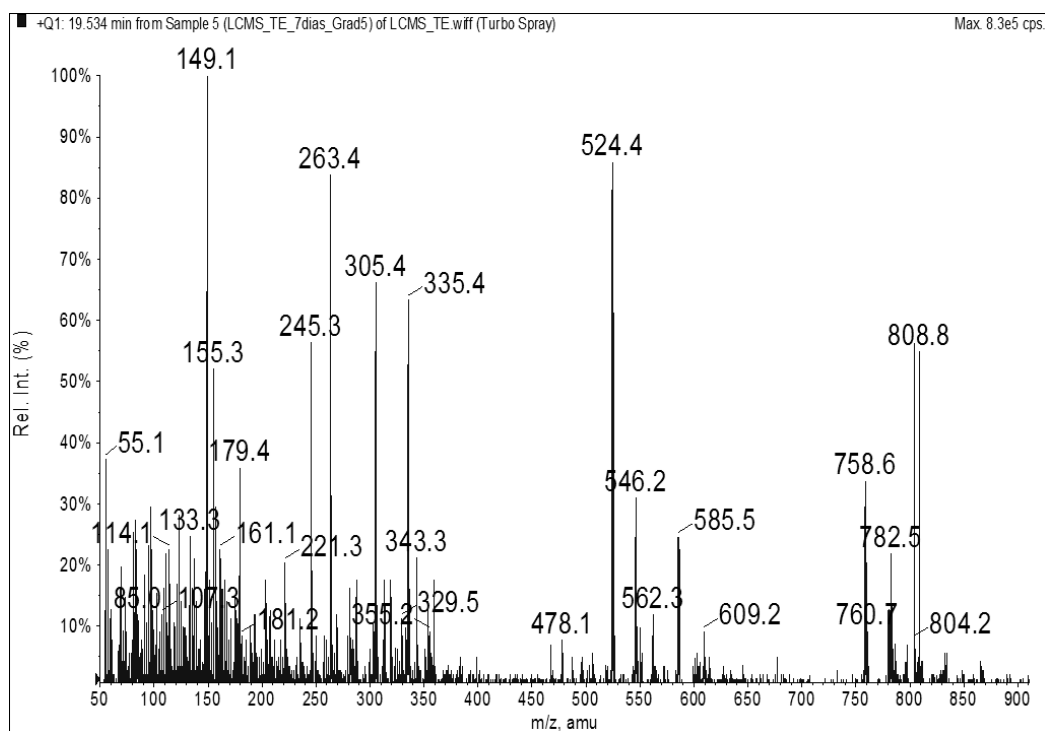


FIGURA 44 – ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 19,5 MINUTOS

Para identificação do íon de  $m/z$  546,6  $[M+H]^+$  foi realizado o experimento de íons produtos por CLAE-EM/EM (Figura 45). Foram observados somente os íons produtos de  $m/z$  104,1 e 487,4 que possibilitaram a identificação do íon de  $m/z$  546,6  $[M+H]^+$  como sendo a LPC (20:3) (LIN *et al.*, 2010).

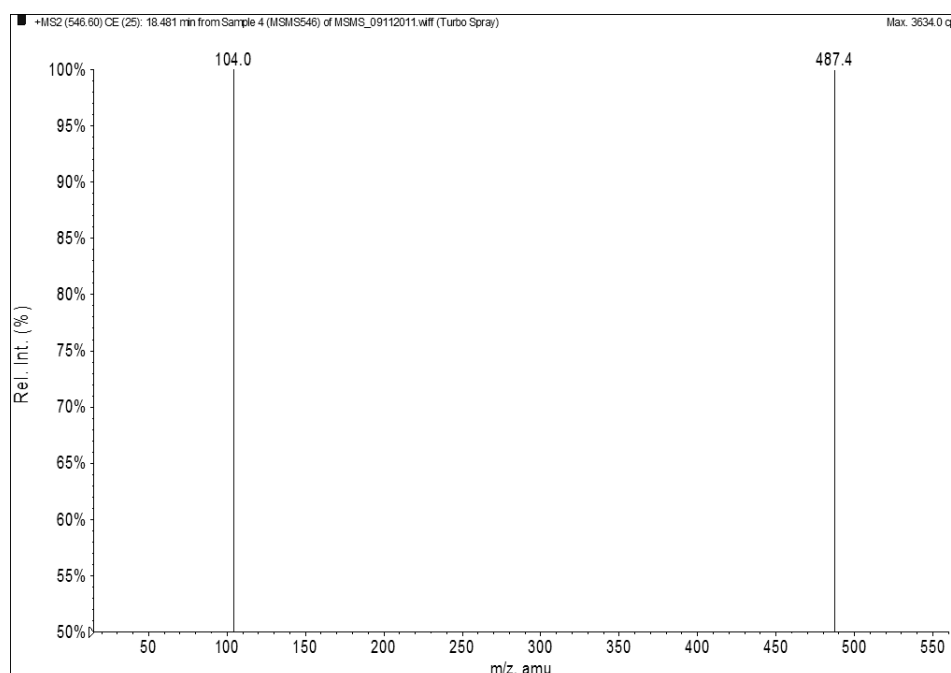


FIGURA 45 – EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE  $m/z$  546,6  $[M+H]^+$  ATRAVES DE CLAE-EM/EM

Os íons de  $m/z$  804,5  $[M+H]^+$  e 808,8  $[M+H]^+$ , também extraídos no tempo e retenção 19,5 minutos, foram identificados como sendo as PC de fórmulas moleculares  $C_{46}H_{78}NO_8P$  e  $C_{46}H_{82}NO_8P$  tendo por base os seus perfis de fragmentação analisados da mesma forma como realizado para as LPC. Esta identificação está em concordância com dados da literatura (LOKHOV *et al.*, 2010).

As PC representam a classe dos lipídios que incorporam a colina em sua cabeça polar e são os componentes principais das membranas celulares dos mamíferos e nos organismos eucarióticos (KOYNOVA; CAFFREY, 1998). A Figura 46 mostra a estrutura geral das PC, sendo possível perceber que elas apresentam uma estrutura química muito semelhante às LPC, diferindo somente no número e tamanho das cadeias graxas ( $R_1$  e  $R_2$ ) no esqueleto do glicerol da molécula de fosfolípido.

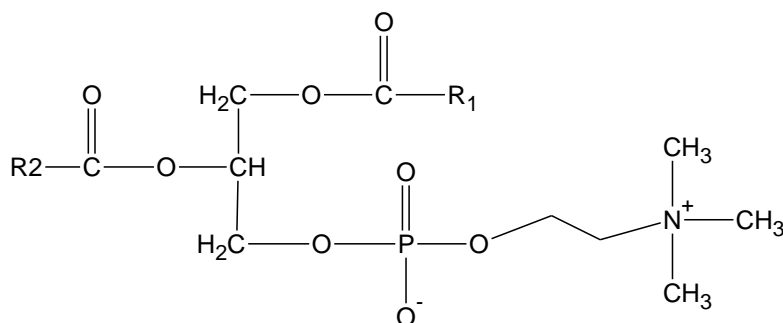


FIGURA 46 – ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DAS FOSFATIDILCOLINAS

A próxima análise foi realizada para os íons extraídos no tempo de retenção de 23,5 minutos: os de  $m/z$  758,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e  $m/z$  833,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Figura 47). Nas análises de DIMS, o íon de  $m/z$  780,6  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  corresponde ao íon de  $m/z$  758,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  adutado com uma molécula de sódio.

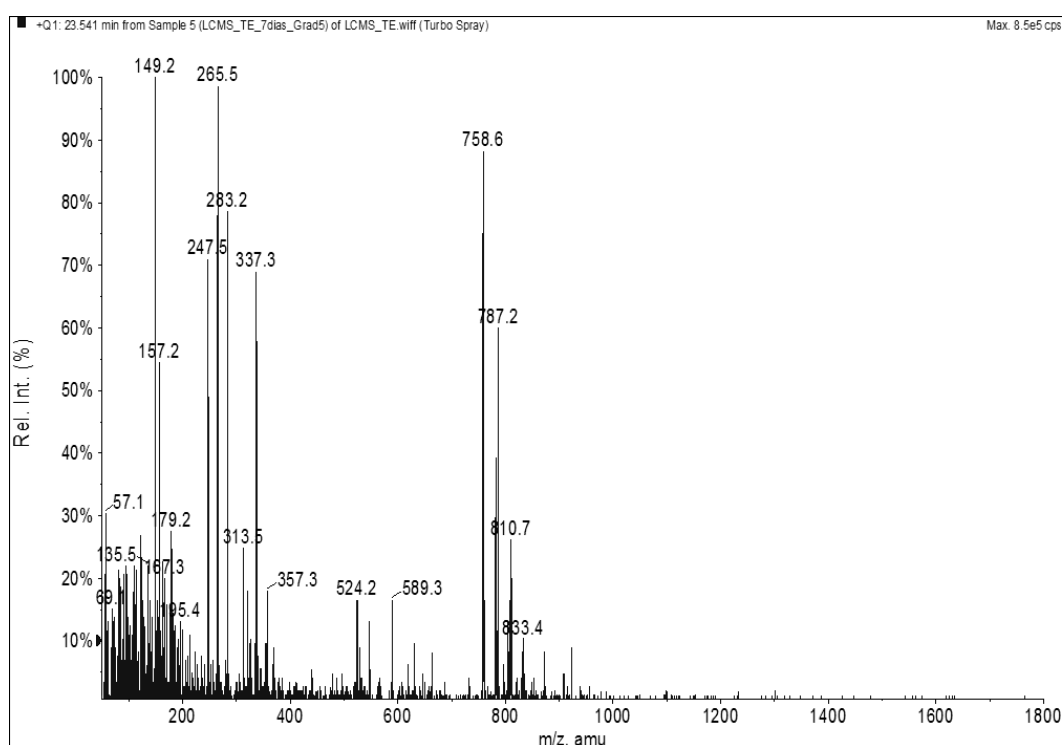


FIGURA 47 – ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 23,5 MINUTOS

Quando o experimento de CLAE-EM/EM foi realizado para o íon de  $m/z$  758,6  $[M+H]^+$ , foi observado o íon produto de  $m/z$  184,1 (Figura 48), sendo portanto, o íon de  $m/z$  758,6  $[M+H]^+$  identificado como a PC de fórmula molecular  $C_{44}H_{78}NO_8P$ .

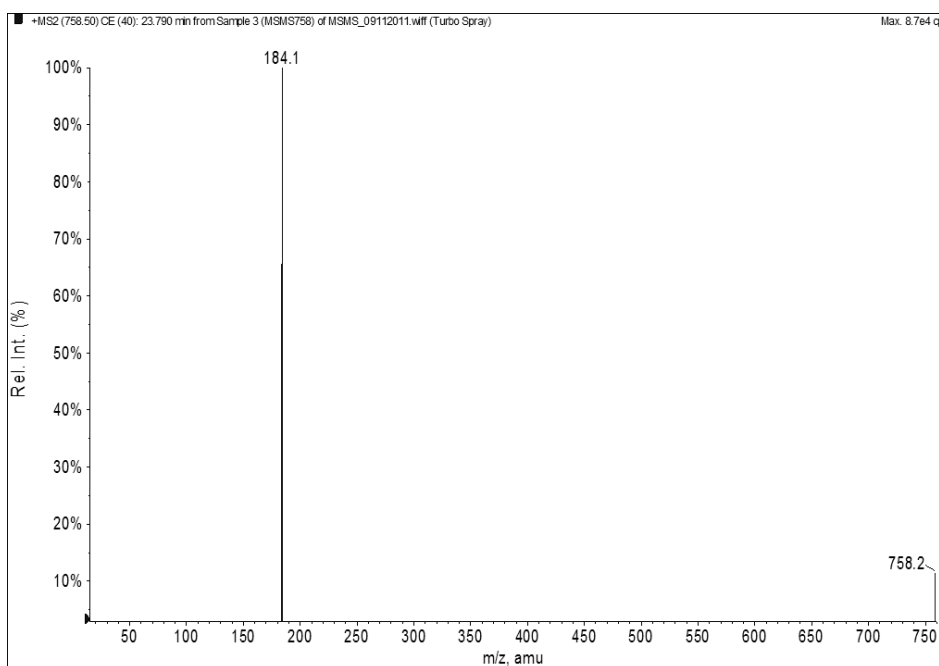


FIGURA 48 – EXPERIMENTO DE IONS PRODUTOS DO ION DE  $m/z$  758,2  $[M+H]^+$  ATRAVES DE CLAE-EM/EM

Quando realizado o experimento de EM/EM para o íon de  $m/z$  780,6  $[M+Na]^+$ , foram encontrados os íons fragmentos de  $m/z$  147 e  $m/z$  184, confirmando, portanto a identificação de íon adutado como sendo a PC de fórmula molecular  $C_{44}H_{78}NO_8P$  (Figura 49).

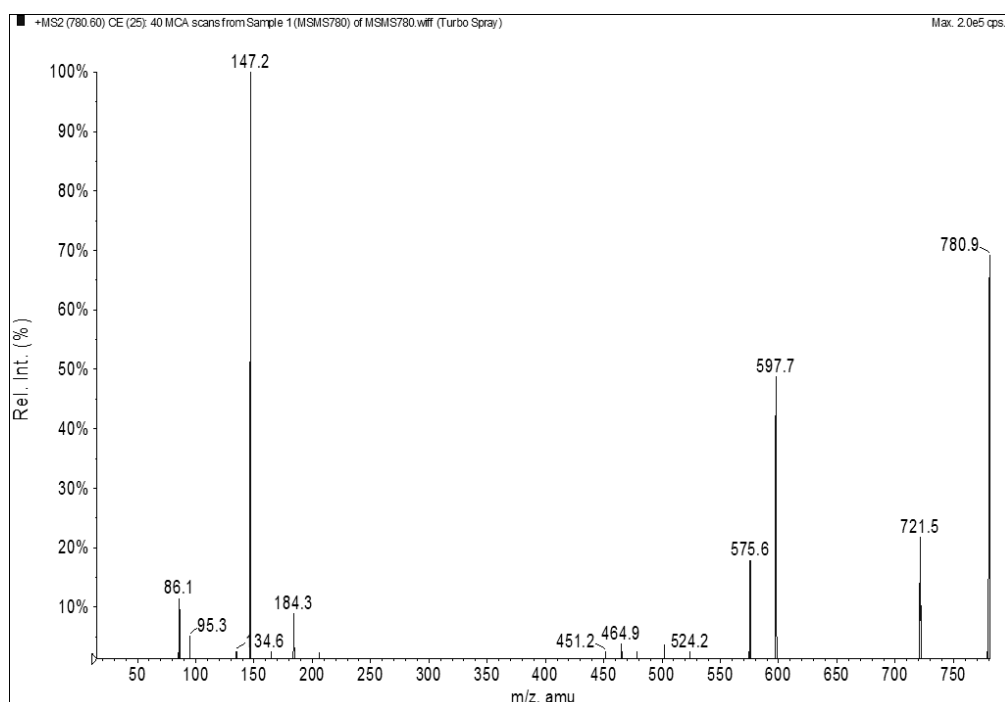


FIGURA 49 – EXPERIMENTO DE ÍONS PRODUTOS DO ÍON DE  $m/z$  780,9  $[M+Na]^+$  ATRAVÉS DE EM/EM (INFUSÃO DIRETA)

O íon de  $m/z$  833,4  $[M+H]^+$  foi identificado após análise de perfil de fragmentação tanto do íon obtido da extração do cromatograma quanto do íon obtido nas análises de DIMS. Ambos os perfis de fragmentação não forneceram o íon produto de  $m/z$  147 e, sendo assim, este íon foi identificado como a PC de fórmula molecular  $C_{48}H_{82}NO_8P$  (LOKHOV *et al.*, 2010).

Finalmente, os íons de  $m/z$  828,6  $[M+H]^+$  e  $m/z$  856,8  $[M+H]^+$  foram encontrados em baixas intensidades de sinais no tempo de retenção de 51 minutos do cromatograma, e por este motivo não foi possível realizar os experimentos de CLAE-EM/EM. No entanto, eles foram fragmentados quando obtidos nos experimentos de DIMS e o íon produto característico de molécula adutada ( $m/z$  147) não apareceu, o que confirma a sua ionização nos experimentos de DIMS na forma de  $[M+H]^+$ . Tomando por base alguns dados encontrados na literatura, estes íons observados foram identificados como PC de fórmulas moleculares  $C_{48}H_{78}NO_8P$  e  $C_{50}H_{82}NO_8P$ , respectivamente (LOKHOV *et al.*, 2010).

Um resumo dos íons identificados nos experimentos de CLAE-EM/EM e EM/EM a partir dos íons detectados nas análises de DIMS é apresentado na Tabela 9.

O perfil de eluição das moléculas identificadas nas análises de CLAE-EM, bem como o perfil de fragmentação das LPC e PC estão de acordo com aqueles encontrados na literatura. Portanto, a identificação realizada foi considerada confiável, mesmo na falta de comparações com padrões de LPC e PC. No entanto, para identificação dos regioisômeros de LPC seriam necessárias análises em equipamento de alta resolução.

---



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 9 – IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DOS FOSFOLIPÍDIOS ENCONTRADOS NO SORO DOS CAMUNDONGOS BALB-C E SWISS INOCULADOS COM TE E S180**

Tr (min)	CLAE-EM/EM				EM/EM (INFUSÃO DIRETA)				Identificação
	ÍON (m/z)	ÍONS PRODUTOS	CE	CXP	ÍON (m/z)	ÍONS PRODUTOS	CE	CXP	
9,71	520,5 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	25	2,0	542,6 [M+Na] <sup>+</sup>	104,1/147,0	20	2,0	LPC (18:2 (9Z, 12Z))
11,4	496,5 [M+H] <sup>+</sup>	86/104,1/ 184,1	40	2,0	518,5 [M+Na] <sup>+</sup>	104,1/147,0	15	3,8	LPC (16:0)
13,2	522,4 [M+H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	LPC (18:1)
17,1	524,3 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	40		546,6 [M+Na] <sup>+</sup>	104,1/ 147,0	20	2,0	LPC (18:0)
19,5	546,6 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 487,1	25	3,0	-	-	-	-	LPC (20:3)
19,5	804,6 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	25	3,0	804,6 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	20	2,0	C <sub>46</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P
19,5	808,8 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	25	3,0	808,8 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	20	2,0	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P
23,5	758,7 [M+H] <sup>+</sup>	184,1	40	2,0	780,6[M+Na] <sup>+</sup>	147,2 / 184,3	25	2,0	C <sub>44</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P
23,5	832,5 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	25	2,0	832,5 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	25	2,0	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P
51,0	828,6 [M+H] <sup>+</sup>	-	-	-	828,6 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	25	2,0	C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P
51,0	856,8 [M+H] <sup>+</sup>	-	-	-	856,8 [M+H] <sup>+</sup>	104,1/ 184,1	20	2,0	C <sub>50</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P

Tr: tempo de retenção; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da cela de colisão,

---

## **5. CONCLUSÃO**

---

Uma vez que o diagnóstico precoce de neoplasias é a chave do sucesso para o bom prognóstico e tratamento da doença, o uso de métodos confiáveis, sensíveis e não invasivos vem sendo estratégicos para a escolha das terapias, contribuindo dessa forma para o aumento da sobrevida dos pacientes ou ainda para a cura da doença. O presente trabalho demonstrou o inédito uso da infusão direta por espectrometria de massas associado a análises quimiométricas (DIMS-PCA) para o diagnóstico precoce de alguns tipos de neoplasias em camundongos, Sendo assim as seguintes conclusões puderam ser evidenciadas neste estudo:

- Apesar das limitações envolvidas com análises de DIMS, como por exemplo, efeitos de matriz que podem resultar em perda de sensibilidade e capacidade de identificação de íons, o método DIMS-PCA, utilizando um equipamento de baixa resolução, apresentou sensibilidade, seletividade e repetibilidade em relação a diferenciação das amostras com e sem câncer. Além disso, não foi necessário muitas etapas de pré-tratamento das amostras.

- Quando aplicado em amostras provenientes de camundongos inoculados com TE, o método de DIMS-PCA foi capaz de classificar as amostras com câncer com a vantagem de fazê-lo após três dias da indução do tumor, um diagnóstico considerado bastante precoce tendo em vista a sobrevida dos animais inoculados com este tumor. Este resultado também foi evidenciado, quando o método DIMS-PCA foi testado em camundongos Swiss inoculados com TE, o que confirma a excelência do método em obter resultados confiáveis em se tratando da reprodutibilidade dos mesmos frente a uma variabilidade genética.

- Quando o método DIMS-PCA foi testado frente a inoculação de outro tipo de célula tumoral, o Sarcoma 180, foi possível também observar a precoce classificação das amostras com câncer. Esse resultado permite dizer mais uma vez que o método é sensível e pode ser utilizado para diferentes tipos de neoplasias, com especificidade, fato bastante favorável se considerarmos que a metodologia venha a ser transposta em casos de neoplasias humanas.

---

- Independente da carga tumoral, uma excelente diferenciação entre os grupos experimental e controle foi observada, em ambas as linhagens de camundongos e tipos de neoplasias estudados, sugerindo que em qualquer estágio da doença o método de DIMS-PCA permite o diagnóstico da doença.

- No presente trabalho, os íons mais relevantes que diferenciaram o grupo experimental do controle foram aqueles relacionados com a classe dos fosfolipídios, particularmente lisofosfatidilcolinas e fosfatidilcolina. Entre eles os de  $m/z$  518,5; 542,6; 546,5; 758,7; 780,6; 804,6; 808,8; 828,6; 832,5 e 856,8; identificados como LPC (16:0), LPC (18:2(9Z, 12Z)), LPC (18:0), PC  $C_{44}H_{78}NO_8P$ , PC  $C_{44}H_{78}NO_8P$ , PC  $C_{46}H_{78}NO_8P$ , PC  $C_{46}H_{82}NO_8P$ , PC  $C_{48}H_{78}NO_8P$ , PC  $C_{48}H_{82}NO_8P$  e PC  $C_{50}H_{82}NO_8P$ , respectivamente. É importante considerar que o principal objetivo do trabalho era poder diferenciar amostras com câncer utilizando dados de massas de baixa resolução aliados com análises quimiométricas. Sabe-se que a identificação dos regioisômeros de LPC devem ser realizadas através de dados de massas obtidos com equipamentos de alta resolução.

- As análises dos mínimos quadrados parciais (PLS) revelaram que é possível prever o estágio de desenvolvimento da doença.

- Sobre todos os aspectos apresentados, pode-se dizer que a possibilidade do diagnóstico precoce de alguns tipos de neoplasias ou a suspeita da doença, por meio de um exame de sangue, realizado de forma rápida e sem a necessidade de procedimentos mais invasivos é bastante atrativo; ainda mais considerando a utilização de um equipamento de baixa resolução, mais robusto e de maior facilidade de aquisição em virtude do seu menor custo (quando comparado a equipamentos de alta resolução). Desta forma, as chances de uma intervenção antes mesmo do quadro clínico tornar-se irreversível são muito maiores, contribuindo para uma melhora de sobrevida do paciente ou até mesmo para a cura da doença.

---

---

## **6. REFERÊNCIAS**

---

Ackerstaff, E.; Glunde, K.; Bhujwalla, Z. M. Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, n. 3, p.525-533, 2003.

Adlercreutz, D.; Wehtje, E. A simple HPLC method for the simultaneous analysis of phosphatidylcholine and its partial hydrolysis products 1-and 2-acyl lysophosphatidylcholine. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 10, p.1007-1011, 2001.

Aggarwal, B. B.; Shishodia, S.; Sandur, S. K.; Pandey, M. K.; Sethi, G. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p.1605-1621, 2006.

Allen, J.; Davey, H. M.; Broadhurst, D.; Heald, J. K.; Rowland, J. J.; Oliver, S. G.; Kell, D. B. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 6, p.692-696, 2003.

Annesley, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 7, p.1041-1044, 2003.

Assef, M. L. M.; Carneiro-Leão, A. M.; Moretão, M. P.; Azambuja, A. P.; Iacomini, M.; Buchi, D. F. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an  $\alpha$ -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 19, n. 2, p.49-54, 2002.

Balkwill, F.; Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p.539-545, 2001.

Banks, R. E.; Stanley, A. J.; Cairns, D. A.; Barrett, J. H.; Clarke, P.; Thompson, D.; Selby, P. J. Influences of blood sample processing on low-molecular-weight proteome identified by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 9, p.1637-1649, 2005.

Baron, A. T.; Boardman, C. H.; Lafky, J. M.; Rademaker, A.; Liu, D.; Fishman, D. A.; Podratz, K. C.; Maihle, N. J. Soluble epidermal growth factor receptor (SEG-FR) and cancer antigen 125 (CA125) as screening and diagnostic tests for epithelial ovarian cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n., p.306-318, 2005.

Barthus, R. C.; Mazo, L. H.; Poppi, R. J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. **Eclética Química**, v. 30, n. 4, p.51-58, 2005.

Bedair, M.; Sumner, L. W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p.238-250, 2008.

Bedrick, E. J.; Lapidus, J.; Powell, J. F. Estimating the Mahalanobis distance from mixed continuous and discrete data. **Biometrics**, v. 56, n. 2, p.394-401, 2000.

---

Boguski, M. S.; McIntosh, M. W. Biomedical informatics for proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p.233-237, 2003.

Brereton, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, n. 11, p.2125-2154, 2000.

Cao, M.; Koulman, A.; Johnson, L. J.; Lane, G. A.; Rasmussen, S. Advanced data-mining strategies for the analysis of direct-infusion ion trap mass spectrometry data from the association of perennial ryegrass with its endophytic fungus, *Neotyphodium lolii*. **Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p.1501-1514, 2008.

Castrillo, J. I.; Hayes, A.; Mohammed, S.; Gaskell, S. J.; Oliver, S. G. An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p.929-937, 2003.

Chace, D. H.; Sherwin, J. E.; Hillman, S. L.; Lorey, F.; Cunningham, G. C. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 12, p.2405-2409, 1998.

Chen, Y. H.; Zhang, R. P.; Song, Y. M.; He, J. M.; Sun, J. H.; Bai, J. F.; An, Z. L.; Dong, L. J.; Zhan, Q. M.; Abliz, Z. RRLC-MS/MS-based metabonomics combined with in-depth analysis of metabolic correlation network: finding potential biomarkers for breast cancer. **Analyst**, v. 134, n. 10, p.2003-2011, 2009.

Chen, Y. Y.; Lin, S. Y.; Yeh, Y. Y.; Hsiao, H. H.; Wu, C. Y.; Chen, S. T.; Wang, A. H. J. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. **Electrophoresis**, v. 26, n. 11, p.2117-2127, 2005.

Chertov, O.; Biragyn, A.; Kwak, L. W.; Simpson, J. T.; Boronina, T.; Hoang, V. M.; Prieto, D. A.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Fisher, R. J. Organic solvent extraction of proteins and peptides from serum as an effective sample preparation for detection and identification of biomarkers by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, n. 4, p.1195-1203, 2004.

Chertov, O.; Simpson, J. T.; Biragyn, A.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Fisher, R. J. Enrichment of low molecular weight protein from biofluids for biomarker discovery. **Expert Review of Proteomics**, v. 2, n. 1, p.139-145, 2005.

Cho, W. C. S. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. **Molecular Cancer**, v. 6, n., 2007.

Claudino, W. M.; Quattrone, A.; Biganzoli, L.; Pestrin, M.; Bertini, I.; Di Leo, A. Metabolomics: Available results, current research projects in breast cancer, and future applications. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 19, p.2840-2846, 2007.

Clurman, B. E.; Roberts, J. M. Cell-Cycle and Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 20, p.1499-1501, 1995.

Constantinou, M. A.; Papakonstantinou, E.; Spraul, M.; Sevastiadou, S.; Costalos, C.; Koupparis, M. A.; Shulpis, K.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Mikros, E. H-1 NMR-based metabonomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, n. 2, p.169-177, 2005.

Coussens, L. M.; Werb, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p.860-867, 2002.

Dagli, M. L. Z.; Guerra, J. L.; Saldiva, P. H. N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p.97-103, 1992.

Dass, C. **Fundamentals of Contemporary mass spectrometry**. Hoboken, New Jersey.: John Wiley & Sons, 2007.

De Maesschalck, R.; Jouan-Rimbaud, D.; Massart, D. L. The Mahalanobis distance. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 50, n. 1, p.1-18, 2000.

De Paula Machado, M. C. F.; Melo-Junior, M. R. Evaluation of antitumoral effect of the *kalanchoe brasiliensis* on the sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, p.1-6, 2009.

Dekker, L. J.; Bosman, J.; Burgers, P. C.; Van Rijswijk, A.; Freije, R.; Luiders, T.; Bischoff, R. Depletion of high-abundance proteins from serum by immunoaffinity chromatography: A MALDI-FT-MS study. **Journal of Chromatography B**, v. 847, n. 1, p.65-69, 2007.

Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 1, p.51-78, 2007.

Dettmer, K.; Hammock, B. D. Metabolomics - A new exciting field within the "omics" sciences. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 7, p.A396-a397, 2004.

Dieterle, F.; Ross, A.; Schlotterbeck, G.; Senn, H. Metabolite projection analysis for fast identification of metabolites in metabonomics. Application in an amiodarone study. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 11, p.3551-3561, 2006.

Dong, J.; Cai, X. M.; Zhao, L. L.; Xue, X. Y.; Zou, L. J.; Zhang, X. L.; Liang, X. M. Lysophosphatidylcholine profiling of plasma: discrimination of isomers and discovery of lung cancer biomarkers. **Metabolomics**, v. 6, n. 4, p.478-488, 2010.

Dooley, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p.471-481, 2003.

Drexler, D. M.; Feyen, J. H. M.; Sanders, M. Mass spectrometry techniques for qualitative and quantitative analysis of biomarkers. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 1, p.17-23, 2004.

Dunn, W. B.; Ellis, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 4, p.285-294, 2005.

---



Ebert, M. P. A.; Korc, M.; Malfertheiner, P.; Rocken, C. Advances, challenges, and limitations in serum-proteome-based cancer diagnosis. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 1, p.19-25, 2006.

Eisenberg, A. L. A.; Koifman, F. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p.377-388, 2001.

Ellis, D. I.; Dunn, W. B.; Griffin, J. L.; Allwood, J. W.; Goodacre, R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 9, p.1243-1266, 2007.

Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p.64-71, 1989.

Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, 1999.

Fiehn, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1-2, p.155-171, 2002.

Foster, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p.144-149, 2008.

Freitas, E. S.; Leite, E. D.; Silva, A. E.; Ocarino, N. M.; Ferreira, E.; Gomes, M. G.; Cassali, G. D.; Serakides, R. Effect of Thyroxine and Propylthiouracil in Ehrlich Ascitic Tumor Cells. **International Journal of Morphology**, v. 24, n. 4, p.665-671, 2006.

Glish, G. L.; Vachet, R. W. The basic of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p.140-150, 2003.

Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Bianchi, G.; Kell, D. B. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils. **Analyst**, v. 127, n. 11, p.1457-1462, 2002.

Gowda, G. A. N.; Zhang, S. C.; Gu, H. W.; Asiago, V.; Shanaiah, N.; Raftery, D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 5, p.617-633, 2008.

Graff, S.; Antopol, W.; Zagal, G.; Agate, F. Influence of Sarcoma-180 on Adenocarcinoma-755 in the Mouse. **Cancer Research**, v. 12, n. 5, p.383-384, 1952.

Griffin, J. L.; Shockcor, J. P. Metabolic profiles of cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p.551-561, 2004.

Griffiths, W. J.; Koal, T.; Wang, Y. Q.; Kohl, M.; Enot, D. P.; Deigner, H. P. Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 49, n. 32, p.5426-5445, 2010.

---

Guan, W.; Zhou, M. S.; Hampton, C. Y.; Benigno, B. B.; Walker, D.; Gray, A.; McDonald, J. F.; Fernandez, F. M. Ovarian cancer detection from metabolomic liquid chromatography/mass spectrometry data by support vector machines. **Bioinformatics**, v. 10, n., 2009.

Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 19, p.2901-2905, 2006.

Hahn, P.; Smith, I. C. P.; Leboldus, L.; Littman, C.; Somorjai, R. L.; Bezabeh, T. The classification of benign and malignant human prostate tissue by multivariate analysis of H-1 magnetic resonance spectra. **Cancer Research**, v. 57, n. 16, p.3398-3401, 1997.

Han, X. L.; Gross, R. W. Structural determination of picomole amounts of phospholipids via electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 6, n. 12, p.1202-1210, 1995.

Han, X. L.; Gross, R. W. Structural determination of lysophospholipid regioisomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 2, p.451-457, 1996.

Heike, Y.; Hosokawa, M.; Osumi, S.; Fujii, D.; Aogi, K.; Takigawa, N.; Ida, M.; Tajiri, H.; Eguchi, K.; Shiwa, M.; Wakatabe, R.; Arikuni, H.; Takaue, Y.; Takashima, S. Identification of serum proteins related to adverse effects induced by docetaxel infusion from protein expression profiles of serum using SELDI ProteinChip system. **Anticancer Research**, v. 25, n. 2B, p.1197-1203, 2005.

Ho, C. S.; Lam, C. W. K.; Chan, M. H. M.; Cheung, R. C. K.; Law, L. K.; Lit, L. C. W.; Ng, K. F.; Suen, M. W. M.; Tai, H. L. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **Clinical Biochemistry Reviews**, v. 24, n. 1, p.3-12, 2003.

Holmes, E.; Nicholls, A. W.; Lindon, J. C.; Connor, S. C.; Connelly, J. C.; Haselden, J. N.; Damment, S. J. P.; Spraul, M.; Neidig, P.; Nicholson, J. K. Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 6, p.471-478, 2000.

Holmes, E.; Nicholls, A. W.; Lindon, J. C.; Ramos, S.; Spraul, M.; Neidig, P.; Connor, S. C.; Connelly, J.; Damment, S. J. P.; Haselden, J.; Nicholson, J. K. Development of a model for classification of toxin-induced lesions using H-1 NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. **NMR in Biomedicine**, v. 11, n. 4-5, p.235-244, 1998.

Hood, B. L.; Zhou, M.; Chan, K. C.; Lucas, D. A.; Kim, G. J.; Issaq, H. J.; Veenstra, T. D.; Conrads, T. P. Investigation of the mouse serum proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 5, p.1561-1568, 2005.

---

Hori, S.; Nishiumi, S.; Kobayashi, K.; Shinohara, M.; Hatakeyama, Y.; Kotani, Y.; Hatano, N.; Maniwa, Y.; Nishio, W.; Bamba, T.; Fukusaki, E.; Azuma, T.; Takenawa, T.; Nishimura, Y.; Yoshida, M. A metabolomic approach to lung cancer. **Lung Cancer**, v. 74, n. 2, p.284-292, 2011.

Ilyin, S. E.; Belkowski, S. M.; Plata-Salaman, C. R. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 8, p.411-416, 2004.

Inca. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home> Acesso:11/24/2011.

Iorio, E.; Mezzanzanica, D.; Alberti, P.; Spadaro, F.; Ramoni, C.; D'ascenzo, S.; Millimaggi, D.; Pavan, A.; Dolo, V.; Canevari, S.; Podo, F. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. **Cancer Research**, v. 65, n. 20, p.9369-9376, 2005.

Issaq, H. J.; Abbott, E.; Veenstra, T. D. Utility of separation science in metabolomic studies. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 11, p.1936-1947, 2008.

Issaq, H. J.; Nativ, O.; Waybright, T.; Luke, B.; Veenstra, T. D.; Issaq, E. J.; Kravstov, A.; Mullerad, M. Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Urology**, v. 179, n. 6, p.2422-2426, 2008.

Issaq, H. J.; Van, Q. N.; Waybright, T. J.; Muschik, G. M.; Veenstra, T. D. Analytical and statistical approaches to metabolomics research. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 13, p.2183-2199, 2009.

Issaq, H. J.; Veenstra, T. D.; Conrads, T. P.; Felschow, D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: Protein profiling and biomarker identification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, n. 3, p.587-592, 2002.

Jia, L. W.; Wang, C.; Kong, H. W.; Cai, Z. W.; Xu, G. W. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of mouse IgA nephropathy. **Metabolomics**, v. 2, n. 2, p.95-104, 2006.

Jouan-Rimbaud, D.; Bouveresse, E.; Massart, D. L.; De Noord, O. E. Detection of prediction outliers and inliers in multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, v. 388, n. 3, p.283-301, 1999.

Kabarowski, J. H. S.; Zhu, K.; Le, L. Q.; Witte, O. N.; Xu, Y. Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A (Retraction of vol 293, pg 702, 2001). **Science**, v. 307, n. 5707, p.206-206, 2005.

Kebarle, P.; Verkerk, U. H. Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 6, p.898-917, 2009.

Kind, T.; Tolstikov, V.; Fiehn, O.; Weiss, R. H. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 2, p.185-195, 2007.

King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p.942-950, 2000.

Kontos, S.; Kominea, A.; Balampanis, K.; Politis, V.; Simaioforidis, V.; Fokitis, I.; Sotiropoulou-Bonikou, G. Chronic inflammation and bladder cancer: How hot is the link? **European Urology Supplements**, v. 8, n. 8, p.608-608, 2009.

Koynova, R.; Caffrey, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. **Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes**, v. 1376, n. 1, p.91-145, 1998.

Kozak, K. R.; Amneus, M. W.; Pusey, S. M.; Su, F.; Luong, M. N.; Luong, S. A.; Reddy, S. T.; Farias-Eisner, R. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: Potential use in diagnosis and prognosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p.12343-12348, 2003.

Kozak, K. R.; Su, F.; Whitelegge, J. P.; Faull, K.; Reddy, S.; Farias-Eisner, R. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. **Proteomics**, v. 5, n. 17, p.4589-4596, 2005.

Kuliszkiewiczjanus, M.; Janus, W.;Baczynski, S. Application of P-31 NMR spectroscopy in clinical analysis of changes of serum phospholipids in leukemia, lymphoma and some other non-haematological cancers. **Anticancer Research**, v. 16, n. 3B, p.1587-1594, 1996.

Kuruma, H.; Egawa, S.; Oh-Ishi, M.; Kodera, Y.; Maeda, T. Proteomic analysis of prostate cancer. **Prostate Cancer and Diseases**, v. 8, n. 1, p.14-21, 2005.

Le, L.; Chi, K.; Tyldesley, S.; Flibotte, S.; Diamond, D. L.; Kuzyk, M. A.; Sadar, M. D. Identification of serum amyloid a as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 4, p.695-707, 2005.

Lerma-Garcia, M. J.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martinez, J. M.; Simo-Alfonso, E. F. Classification of vegetable oils according to their botanical origin using sterol profiles established by direct infusion mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 7, p.973-978, 2008.

Li, J. N.; Orlandi, R.; White, C. N.; Rosenzweig, J.; Zhao, J.; Seregini, E.; Morelli, D.; Yu, Y. H.; Meng, X. Y.; Zhang, Z.; Davidson, N. E.; Fung, E. T.; Chan, D. W. Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p.2229-2235, 2005.

---

Liebisch, G.; Drobnik, W.; Lieser, B.; Schmitz, G. High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 12, p.2217-2224, 2002.

Lin, C. Y.; Viant, M. R.; Tjeerdema, R. S. Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, n. 3, p.245-251, 2006.

Lin, L.; Yu, Q. A.; Yan, X. M.; Hang, W.; Zheng, J. X.; Xing, J. C.; Huang, B. L. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer. **Analyst**, v. 135, n. 11, p.2970-2978, 2010.

Lokhov, P. G.; Dashtiev, M. I.; Moshkovskii, S. A.; Archakov, A. I. Metabolite profiling of blood plasma of patients with prostate cancer. **Metabolomics**, v. 6, n. 1, p.156-163, 2010.

Lokhov, P. G.; Kharybin, O. N.; Archakov, A. I. Diagnosis of lung cancer based on direct-infusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 309, n., p.200-205, 2012.

Lu, X.; Zhao, X.; Bai, C.; Zhao, C.; Lu, G.; Xu, G. LC-MS-based metabonomics analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 866, n. 1-2, p.64-76, 2008.

Luque-Garcia, J. L.; Neubert, T. A. Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p.259-276, 2007.

Madsen, R.; Lundstedt, T.; Trygg, J. Chemometrics in metabolomics-A review in human disease diagnosis. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, n. 1-2, p.23-33, 2010.

Malik, G.; Ward, M. D.; Gupta, S. K.; Trosset, M. W.; Grizzle, W. E.; Adam, B. L.; Diaz, J. I.; Semmes, O. J. Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 3, p.1073-1085, 2005.

Manisali, I.; Chen, D. D. Y.; Schneider, B. B. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 3, p.243-256, 2006.

Maronpot, R. R.; Flakem, G.; Huff, J. Relevance of Animal Carcinogenesis Findings to Human Cancer Predictions and Prevention. **Toxicologic Pathology**, v. 32, n. Supl. 1, p.40-48, 2004.

Matos, G. D.; Pereira-Filho, E. R.; Poppi, R. J.; Arruda, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: pca e pca de imagens. **Revista Analytica**, v. 06, n. 08, p.38-50, 2003.

---

Matos, L. L.; Machado, L. N.; Sugiyama, M. M.; Bozzetti, R. M.; Pinhal, M. A. S. Technology applied in the detection of tumor markers. **Arquivos Médicos do ABC**, v. 5, n. 1, p.19-25, 2005.

Mcdougall, G.; Martinussen, I.; Stewart, D. Towards fruitful metabolomics: High throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p.362-369, 2008.

Merrell, K.; Southwick, K.; Graves, S. W.; Esplin, M. S.; Lewis, N. E.; Thulin, C. D. Analysis of Low-Abundance Low-Molecular-Weight Serum Proteins Using Mass Spectrometry. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, n. 4, p.238-248, 2004.

Mettler, N. E.; Clarke, D. H.; Casals, J. Virus Inoculation in Mice Bearing Ehrlich Ascitic Tumors - Antigen Production and Tumor-Regression. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p.23-27, 1982.

Moco, S.; Bino, R. J.; De Vos, R. C. H.; Vervoort, J. Metabolomics technologies and metabolite identification. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p.855-866, 2007.

Molinari, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, v. 33, n. 5, p.261-274, 2000.

Mountford, C. E.; Somorjai, R. L.; Malycha, P.; Gluch, L.; Lean, C.; Russell, P.; Barraclough, B.; Gillett, D.; Himmelreich, U.; Dolenko, B.; Nikulin, A. E.; Smith, I. C. P. Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy of fine-needle aspirates analysed using a statistical classification strategy. **British Journal of Surgery**, v. 88, n. 9, p.1234-1240, 2001.

Mrozinski, P.; Zolotarjova, N.; Chen, H.; Barrett, W.; Martosella, J.; Nicol, G.; Yang, L. S. Removal of multiple high-abundant proteins from mouse plasma using immunoaffinity depletion. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 10, p.S222-S222, 2004.

Nam, H.; Chung, B. C.; Kim, Y.; Lee, K.; Lee, D. Combining tissue transcriptomics and urine metabolomics for breast cancer biomarker identification. **Bioinformatics**, v. 25, n. 23, p.3151-3157, 2009.

Nascimento, F. R. F.; Cruz, G. V.; Pereira, P. V. S.; Maciel, M. C. G.; Silva, L. A.; Azevedo, A. P. S.; Barroqueiro, E. S. B.; Guerra, R. N. M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, n. 22, p.2650-2653, 2006.

Nci. Defining cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>> Acesso em: 11/24.

Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Systems biology - Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p.1054-1056, 2008.

Odunsi, K.; Wollman, R. M.; Ambrosone, C. B.; Hutson, A.; Mccann, S. E.; Tammela, J.; Geisler, J. P.; Miller, G.; Sellers, T.; Cliby, W.; Qian, F.; Keitz, B.; Intengan, M.; Lele, S.; Alderfer, J. L. Detection of epithelial ovarian cancer using (1)H-NMR-based metabonomics. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 5, p.782-788, 2005.

Okita, M.; Gaudette, D. C.; Mills, G. B.; Holub, B. J. Elevated levels and altered fatty acid composition of plasma lysophosphatidylcholine (lysoPC) in ovarian cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 71, n. 1, p.31-34, 1997.

Ozaslan, M.; Karagoz, I. D.; Kilic, I. H.; Guldur, M. E. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p.2375-2378, 2011.

Park, M. T.; Lee, S. J. Cell cycle and cancer. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p.60-65, 2003.

Petricoin, E. F.; Ardekani, A. M.; Hitt, B. A.; Levine, P. J.; Fusaro, V. A.; Steinberg, S. M.; Mills, G. B.; Simone, C.; Fishman, D. A.; Kohn, E. C.; Liotta, L. A. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. **Lancet**, v. 359, n. 9306, p.572-577, 2002.

Phillips, M.; Cataneo, R. N.; Cummin, A. R. C.; Gagliardi, A. J.; Gleeson, K.; Greenberg, J.; Maxfield, R. A.; Rom, W. N. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. **Chest**, v. 123, n. 6, p.2115-2123, 2003.

Phillips, M.; Gleeson, K.; Hughes, J. M. B.; Greenberg, J.; Cataneo, R. N.; Baker, L.; Mcvay, W. P. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p.1930-1933, 1999.

Pierna, J. A. F.; Wahl, F.; De Noord, O. E.; Massart, D. L. Methods for outlier detection in prediction. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 63, n. 1, p.27-39, 2002.

Plumb, R. S.; Stumpf, C. L.; Gorenstein, M. V.; Castro-Perez, J. M.; Dear, G. J.; Anthony, M.; Sweatman, B. C.; Connor, S. C.; Haselden, J. N. Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 20, p.1991-1996, 2002.

Rai, A. J.; Zhang, Z.; Rosenzweig, J.; Shih, I.; Pham, T.; Fung, E. T.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W. Proteomic approaches to tumor marker discovery - Identification of biomarkers for ovarian cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 126, n. 12, p.1518-1526, 2002.

Rashed, M. S. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. **Journal of Chromatography B**, v. 758, n. 1, p.27-48, 2001.

---

Riedinger, J. M.; Wafflart, J.; Ricolleau, G.; Eche, N.; Larbre, H.; Basuyau, J. P.; Dalifard, I.; Hacene, K.; Pichon, M. F. CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. **Annals of Oncology**, v. 17, n. 8, p.1234-1238, 2006.

Ritchie, S. A.; Ahiahonu, P. W. K.; Jayasinghe, D.; Heath, D.; Liu, J.; Lu, Y. S.; Jin, W.; Kavianpour, A.; Yamazaki, Y.; Khan, A. M.; Hossain, M.; Su-Myat, K. K.; Wood, P. L.; Krenitsky, K.; Takemasa, I.; Miyake, M.; Sekimoto, M.; Monden, M.; Matsubara, H.; Nomura, F.; Goodenowe, D. B. Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: implications for early screening and detection. **Bmc Medicine**, v. 8, n., 2010.

Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 15, p.3653-3659, 2000.

Rosenblatt, K. P.; Bryant-Greenwood, P.; Killian, J. K.; Mehta, A.; Geho, D.; Espina, V.; Petricoin, E. E.; Liotta, L. A. Serum proteomics in cancer diagnosis and management. **Annual Review of Medicine**, v. 55, n., p.97-112, 2004.

Russell, P.; Lean, C. L.; Delbridge, L.; May, G. L.; Dowd, S.; Mountford, C. E. Proton Magnetic-Resonance and Human Thyroid Neoplasia .1. Discrimination between Benign and Malignant Neoplasms. **American Journal of Medicine**, v. 96, n. 4, p.383-388, 1994.

Ryan, D.; Robards, K. Metabolomics: The greatest omics of them all? **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 23, p.7954-7958, 2006.

Sato, D. Y. O.; Wal, R.; Oliveira, C. C.; Cattaneo, R. I. I.; Malvezzi, M.; Gabardo, J.; Buchi, D. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, n. 1, p.26-32, 2005.

Sauter, E. R.; Shan, S. M.; Hewett, J. E.; Speckman, P.; Du Bois, G. C. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid using SELDI-TOF-MS. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 5, p.791-796, 2005.

Sawyers, C. L. The cancer biomarker problem. **Nature**, v. 452, n. 7187, p.548-552, 2008.

Scholz, M.; Gatzek, S.; Sterling, A.; Fiehn, O.; Selbig, J. Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. **Bioinformatics**, v. 20, n. 15, p.2447-2454, 2004.

Silva, A. E.; Santos, F. G. A.; Cassali, G. D. Cell proliferation markers for evaluating the growth of solid and ascitic forms of Ehrlich tumor. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p.658-661, 2006.

---



Silva, C. W. P. **Análise de biofluidos através de RMN aliada a quimiometria para caracterização de tumores e seu diagnóstico precoce**. 152 f. - Dissertação (Mestrado em Química), Setor de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

Siuzdak, G. Mass spectrometry for biotechnology. **Academic Press**, 1996.

Smedsgaard, J.; Frisvad, J. C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, n. 1, p.5-17, 1996.

Somorjai, R. L.; Dolenko, B.; Nikulin, A. K.; Pizzi, N.; Scarth, G.; Zhilkin, P.; Halliday, W.; Fewer, D.; Hill, N.; Ross, I.; West, M.; Smith, I. C. P.; Donnelly, S. M.; Kuesel, A. C.; Briere, K. M. Classification of H-1 MR spectra of human brain neoplasms: The influence of preprocessing and computerized consensus diagnosis on classification accuracy. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 6, n. 3, p.437-444, 1996.

Somorjai, R. L.; Nikulin, A. E.; Pizzi, N.; Jackson, D.; Scarth, G.; Dolenko, B.; Gordon, H.; Russell, P.; Lean, C. L.; Delbridge, L.; Mountford, C. E.; Smith, I. C. P. Computerized Consensus Diagnosis - a Classification Strategy for the Robust Analysis of Mr Spectra .1. Application to H-1 Spectra of Thyroid Neoplasms. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 33, n. 2, p.257-263, 1995.

Soper, R.; Himmelreich, U.; Painter, D.; Somorjai, R. L.; Lean, C. L.; Dolenko, B.; Mountford, C. E.; Russell, P. Pathology of hepatocellular carcinoma and its precursors using proton magnetic resonance spectroscopy and a statistical classification strategy. **Pathology**, v. 34, n. 5, p.417-422, 2002.

Srinivas, P. R.; Verma, M.; Zhao, Y. M.; Srivastava, S. Proteomics for cancer biomarker discovery. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 8, p.1160-1169, 2002.

Sullentrop, F.; Moka, D.; Neubauer, S.; Haupt, G.; Engelmann, U.; Hahn, J.; Schicha, H. P-31 NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma. **NMR in Biomedicine**, v. 15, n. 1, p.60-68, 2002.

Sumner, L. W.; Mendes, P.; Dixon, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p.817-836, 2003.

Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science**, v. 306, n. 5695, p.471-473, 2004.

Taylor, L.; Arends, J.; Hodina, A.; Pletschen, L.; Unger, C.; Massing, U. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory state. **Onkologie**, v. 31, n., p.149-149, 2008.

Thomson, B. A.; Davidson, W. R.; Lovett, A. M. Applications of a Versatile Technique for Trace Analysis - Atmospheric-Pressure Negative Chemical Ionization. **Environmental Health Perspectives**, v. 36, n. Jun, p.77-84, 1980.

Tirumalai, R. S.; Chan, K. C.; Prieto, D. A.; Issaq, H. J.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, n. 10, p.1096-1103, 2003.

Tiziani, S.; Lopes, V.; Gunther, U. L. Early Stage Diagnosis of Oral Cancer Using (1)H NMR-Based Metabolomics. **Neoplasia**, v. 11, n. 3, p.269-U69, 2009.

Tolson, J.; Bogumil, R.; Brunst, E.; Beck, H.; Elsner, R.; Humeny, A.; Kratzin, H.; Deeg, M.; Kuczyk, M.; Mueller, G. A.; Mueller, C. A.; Flad, T. Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal cancer patients (vol 84, pg 845, 2004). **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 9, p.1220-1221, 2004.

Trygg, J.; Holmes, E.; Lundstedt, T. Chemometrics in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p.469-479, 2007.

Urayama, S.; Zou, W.; Brooks, K.; Tolstikov, V. Comprehensive mass spectrometry based metabolic profiling of blood plasma reveals potent discriminatory classifiers of pancreatic cancer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 5, p.613-620, 2010.

Van Bramer, S. E. **An Introduction to Mass Spectrometry**. Chester, PA, 1997.

Veenstra, T. D.; Corads, T. P.; Hood, B. L.; Avellino, A. M.; Ellenbogen, R. G.; Morrison, R. S. Biomarkers: Mining the Biofluid Proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 4, p.409-418, 2005.

Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p.131-149, 2003.

Villar-Garea, A.; Griesse, M.;Imhof, A. Biomarker discovery from body fluids using mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 849, n. 1-2, p.105-114, 2007.

Villas-Boas, S. G.; Mas, S.; Akesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p.613-646, 2005.

Wallace, J. C.; Raaphorst, G. P.; Somorjai, R. L.; Ng, C. E.; Fung, M. F. K.; Senterman, M.; Smith, I. C. P. Classification of H-1 MR spectra of biopsies from untreated and recurrent ovarian cancer using linear discriminant analysis. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 38, n. 4, p.569-576, 1997.

Want, E. J.; Cravatt, B. F.; Siuzdak, G. The Expanding Role of Mass Spectrometry in Metabolite Profiling and Characterization. **ChemBioChem**, v. 6, n. 11, p.1941-1951, 2005.

---

Want, E. J.; O'maille, G.; Smith, C. A.; Brandon, T. R.; Uritboonthai, W.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Siuzdak, G. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p.743-752, 2006.

Waters, N. J.; Holmes, E.; Williams, A.; Waterfield, C. J.; Farrant, R. D.; Nicholson, J. K. NMR and pattern recognition studies on the time-related metabolic effects of alpha-naphthylisothiocyanate on liver, urine, and plasma in the rat: An integrative metabonomic approach. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 10, p.1401-1412, 2001.

Weinstein, I. B.; Case, K. The history of cancer research: Introducing an AACR Centennial series. **Cancer Research**, v. 68, n. 17, p.6861-6862, 2008.

Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 3, p.675-679, 1985.

Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Eisner, R.; Young, N.; Gautam, B.; Hau, D. D.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bouatra, S.; Mandal, R.; Sinelnikov, I.; Xia, J. G.; Jia, L.; Cruz, J. A.; Lim, E.; Sobsey, C. A.; Shrivastava, S.; Huang, P.; Liu, P.; Fang, L.; Peng, J.; Fradette, R.; Cheng, D.; Tzur, D.; Clements, M.; Lewis, A.; De Souza, A.; Zuniga, A.; Dawe, M.; Xiong, Y. P.; Clive, D.; Greiner, R.; Nazyrova, A.; Shaykhutdinov, R.; Li, L.; Vogel, H. J.; Forsythe, I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n., p.D603-D610, 2009.

Woo, H. M.; Kim, K. M.; Choi, M. H.; Jung, B. H.; Lee, J.; Kong, G.; Nam, S. J.; Kim, S.; Bai, S. W.; Chung, B. C. Mass spectrometry based metabolomic approaches in urinary biomarker study of women's cancers. **Clinica Chimica Acta**, v. 400, n. 1-2, p.63-69, 2009.

Woong-Shick, A.; Sung-Pil, P.; Su-Mi, B.; Joon-Mo, L.; Sung-Eun, N.; Gye-Hyun, N.; Young-Lae, C.; Ho-Sun, C.; Heung-Jae, J.; Chong-Kook, K.; Young-Wan, K.; Byoung-Don, H.; Hyun-Sun, J. Identification of hemoglobin-alpha and -beta subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer. **Cancer Science**, v. 96, n. 3, p.197-201, 2005.

Wu, H.; Xue, R. Y.; Dong, L.; Liu, T. T.; Deng, C. H.; Zeng, H. Z.; Shen, X. Z. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 648, n. 1, p.98-104, 2009.

Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p.4451-4459, 1984.

Yang, J.; Xu, G. W.; Zheng, W. F.; Kong, H. W.; Wang, C.; Zhao, X. J.; Pang, T. Strategy for metabonomics research based on high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1084, n. 1-2, p.214-221, 2005.

Yang, J.; Zhao, X. J.; Liu, X. L.; Wang, C.; Gao, P.; Wang, J. S.; Li, L. J.; Gu, J. R.; Yang, S. L.; Xu, G. W. High performance liquid chromatography-mass spectrometry for metabonomics: Potential biomarkers for acute deterioration of liver function in chronic hepatitis B. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 3, p.554-561, 2006.

Yang, J.; Zheng, Y. F.; Kong, H. W.; Pang, T.; Lv, S.; Yang, Q.; Xu, G. W. Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. **Journal of Chromatography B**, v. 813, n. 1-2, p.59-65, 2004.

Yap, I. K. S. Why Metabonomics? **International e-Journal of Science, Medicine & Education**, v. 5, n. 1, p.17-26, 2011.

Ye, B.; Cramer, D. W.; Skates, S. J.; Gygi, S. P.; Pratomo, V.; Fu, L. F.; Horick, N. K.; Licklider, L. J.; Schorge, J. O.; Berkowitz, R. S.; Mok, S. C. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: Identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 8, p.2904-2911, 2003.

Yin, P. Y.; Zhao, X. J.; Li, Q. R.; Wang, J. S.; Li, J. S.; Xu, G. W. Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultraperformance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS) (vol 5, pg 2135, 2006). **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 8, p.3635-3635, 2008.

Zhang, F. X.; Jia, Z. H.; Gao, P.; Kong, H. W.; Li, X.; Chen, J.; Yang, Q.; Yin, P. Y.; Wang, J. S.; Lu, X.; Li, F. M.; Wu, Y. L.; Xu, G. W. Metabonomics study of atherosclerosis rats by ultra fast liquid chromatography coupled with ion trap-time of flight mass spectrometry. **Talanta**, v. 79, n. 3, p.836-844, 2009.

Zhang, X.; Wei, D.; Yap, Y.; Li, L.; Guo, S.; Chen, F. Mass Spectrometry-based "omics". Technologies in cancer diagnostics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 3, p.403-431, 2007.

Zhang, X. W.; Li, L.; Wei, D.; Chen, F. Moving cancer diagnostics from bench to bedside. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p.166-173, 2007.

Zhang, Z.; Bast, R. C.; Yu, Y. H.; Li, J. N.; Sokoll, L. J. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 16, p.5882-5890, 2004.

Zhou, M.; Lucas, D. A.; Chan, K. C.; Issaq, H. J.; Petricoin, E. F.; Liotta, L. A.; Veenstra, T. D.; Conrads, T. R. An investigation into the human serum "interactome". **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p.1289-1298, 2004.

Zytkovicz, T. H.; Fitzgerald, E. F.; Marsden, D. et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New England newborn screening program. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 11, p.1945-1955, 2001.

---